T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

VASKÜLER TUTULUMLU BEHÇET HASTALIĞI VE DİĞER ROMATOLOJİK HASTALIKLARDA NETOSİS'İN ROLÜ

ÇİĞDEM ÇETİN

DANIŞMAN
PROF.DR. ESİN ÇETİN

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2026

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çiğdem Çetin

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında "Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi" Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Bu tezi, sessizce mücadele eden ve vazgeçmeyen tüm kadınlara ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve bilimsel yaklaşımıyla her aşamada yol gösteren; tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması sürecinde değerli görüşleriyle bana öncülük eden, karşılaştığım güçlüklerde destekleyici yaklaşımıyla motivasyonumu korumamı sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Esin Çetin'e,

Doktora eğitimim boyunca sağladığı eğitim ve araştırma olanakları ile bilimsel yaklaşımından yararlanma fırsatı bulduğum, bilimsel çalışmalarıyla ulusal ve uluslararası düzeyde immünoloji alanında önemli katkılar sunan değerli hocam, İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Tez çalışmamın şekillenmesinde değerli görüşleriyle yol gösteren, ayrıca romatoloji yan dal eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, bilimsel çalışmalarıyla, ulusal ve uluslararası düzeyde bilime önemli katkılar sunan değerli hocam, Romatoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Gül'e,

Doktora sürecinde değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Umut Can Küçüksezer, Prof. Dr. Sema Bilgiç Gazioğlu, Prof. Dr. Güher Saruhan Direskeneli, Prof. Dr. Suzan Çınar, Doç. Dr. Metin Yusuf Gelmez, Dr. Öğr. Üyesi Nilgün Akdeniz hocalarıma,

Tez çalışmamın deneysel aşamalarında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak, desteklerini esirgemeyen Ayşenur Kökoğlu ve Abdullah Yılmaz'a,

Tez çalışmam süresince değerli destek ve katkılarıyla yardımcı olan Uzm. Dr. Erdem Bektaş ve Prof. Dr. Cemal Bes'e,

Tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını her zaman hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Prof. Dr. Halil Harman ve Doç. Dr. Mehmet Ali Balcı'ya,

Hayatım boyunca sevgilerini hissettiğim, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince destekleriyle bana güç veren aileme, ayrıca varlığıyla bana huzur ve mutluluk veren biricik yeğenim Kaan Şen'e içten teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TUSEB) (Program kodu: 2023-B-01- B Grubu AR-GE proje çağrısı, Proje No: 32568) tarafından desteklenmiştir.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programında Doktora öğrencisi Çiğdem Çetin tarafından Prof.Dr. Esin Çetin'in danışmanlığında hazırlanan "Vasküler tutulumlu Behçet hastalığı ve diğer romatolojik hastalıklarda NETosis'in rolü" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19 /06/ 2026 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Günnur Deniz
İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
İmmünoloji Anabilim Dalı

Jüri
Dr.Öğretim Üyesi Nilgün Akdeniz
İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
İmmünoloji Anabilim Dalı

Jüri
Prof. Dr. Ahmet Gül
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları A.D.

Jüri
Prof. Dr. Halil Harman
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon A.D.

Jüri
Doç. Dr.Sibel Penbe Yentür
İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi, İmmünoloji A.D.

Jüri-(Danışman)
Prof. Dr. Esin Aktaş Çetin
İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
İmmünoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Nötrofil Gelişimi 4
2.1.1. Nötrofillerin Morfolojik Özellikleri ve Granüler Yapısı 5
2.1.2. Nötrofillerin Efektör Fonksiyonları 6
2.1.3. Nötrofil Heterojenitesi ve Nötrofil Alt Grupları 9
2.1.3.1. Düşük Dansiteli Nötrofiller 11
2.2. Nötrofil Hücre Ölüm Mekanizmaları 15
2.2.1. NETosis 17
2.2.1.1. NETosis mekanizmaları 18
2.2.1.2. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzak (NET) Ölçümünde Kullanılan Yöntemler 21
2.3. Romatolojik Hastalıklarda NETosis 23
2.4. Behçet Hastalığının Klinik ve Genetik Özellikleri 25
2.4.1. Behçet Hastalığında Sınıflandırma Kriterleri ve Hastalık Aktivitesi 28
2.4.2. Behçet Hastalığının İmmünopatogenezi 30
2.4.3. Behçet Hastalığında Nötrofiller ve NETosis 32
2.4.4. Behçet Hastalığında Vasküler Tutulumda Nötrofil Ekstrasellüler Tuzaklar 33
2.5. Tromboz ve NETosis 34
2.6. ANCA İlişkili Vaskülitlerin Genel Özellikleri 36
2.6.1. Granülomatöz Polianjitis Sınıflandırma Kriterleri ve Hastalık Aktivitesi 39
2.6.2. ANCA İlişkili Vaskülitlerin İmmünopatogenezinde Nötrofiller ve NETosis 40

2.7. Antifosfolipid Sendromunun Klinik, Serolojik ve Epidemiyolojik Özellikleri.....44
2.7.1. Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterleri 46
2.7.2. Antifosfolipid Sendromu İmmünopatogenezi 47
2.7.3. Antifosfolipid Sendromunda Tromboz, Nötrofiller ve NETosis 49
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....51
3.1. Çalışma Grupları ve Katılımcı Seçimi.....51
3.2. Periferik Kan Örneklerinin Toplanması 52
3.2.1. Periferik Kandan Nötrofil İzolasyonu.....53
3.2.2. Düşük Dansiteli Nötrofil İzolasyonu 53
3.2.3. Nötrofillerin Kültür Aşamaları için Doz Belirleme Deneyleri 56
3.2.4. In Vitro Kültür Aşamaları.....56
3.3. Nötrofil Reaktif Oksijen Ürünlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Analizi.....57
3.4. NETosis Belirteçlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Analizi 57
3.5. Nötrofil Alt Gruplarında Apoptozis Oranlarının Akan Hücre Ölçer ile Analizi ...58
3.6. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzakların Fluoresan Görüntü Analizi 58
3.7. Sitrolinlenmiş Histon H3, Miyeloperoksidaz, Nötrofil Elastaz ve Peptidil Arjinin Deiminaz-4 Düzeylerinin Tayini 59
3.8. Hücresiz çift zincirli DNA Miktarının Serum ve Kültür Üst Sıvılarında Analizi .59
3.9. İstatistiksel Analiz 60
4. BULGULAR 61
4.1. Hasta Gruplarının Demografik Özellikleri 61
4.2. Nötrofillerin İn Vitro Kültür Aşamaları İçin Doz Belirleme Deney Sonuçları 64
4.2.1. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının Nötrofil Canlılığına Etkileri.....64
4.2.2. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının NETosis Belirteçlerine Etkileri 66
4.2.3. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının ROS Düzeylerine Etkileri.....67
4.3. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi İle Analizi 68
4.3.1. Hastalık Alt Gruplarında Reaktif Oksijen Ürünlerinin Analiz Sonuçları.....68
4.3.2. Normal ve Düşük Dansiteli Nötrofillerde Hasta Gruplarında Reaktif Oksijen Ürünlerinin Değişimleri.....71
4.4. NETosis Belirteçlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi İle Analizi 72
4.4.1. NETosis Belirteçlerinin Hastalık Alt Gruplarında Değerlendirilmesi.....72
4.4.2. Tüm Hastalık Gruplarında NETosis Belirteçlerinin Değişimlerinin Kıyaslanması.....76

4.5. Nötrofil Alt Gruplarında Apoptotik İndeks ve Canlılık Oranlarının Belirlenmesi.78
4.6. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzakların Fluoresan Görüntü Analizi 84
4.7. Serumda ve Kültür Üst Sıvılarında NETosis Belirteçlerinin Düzeylerinin Belirlenmesi 88
4.7.1. Hasta Grupları Serum Örneklerinde ELISA Sonuçları 89
4.7.2. Normal ve Düşük Dansiteli Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 ELISA Sonuçları 90
4.7.2.1. Tüm Hasta Gruplarında Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 ELISA Sonuçları 92
4.7.3. Plazma ve Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında Hücresiz Çift zincirli Serbest DNA (cf-dsDNA) Düzeyleri 96
4.7.4. Serum ve Nötrofil Kültür Üst Sıvıları NETosis Belirteçleri Arasındaki Korelasyon Analizleri 99
4.7.5. NETosis Belirteçleri ile Klinik ve Laboratuvar Paratmetreleri Arasındaki Korelasyon Analizleri 100
5. TARTIŞMA 104
6.SONUÇ 112
KAYNAKLAR 113
FORMLAR 126
ETİK KURUL ONAYI 128
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 129

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Revize Sapporo (Sidney) Antifosfolipid Sendromu sınıflandırma kriterleri [214]..... 46
Tablo 2. Kullanılan monoklonal antikorlar ve deney malzemeleri 54
Tablo 3. Nötrofil deneylerinde kullanılan laboratuvar cihazları 55
Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarının demografik ve laboratuvar özellikleri..... 62
Tablo 5. Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterlerine (ICBD 2014) göre Behçet hastalarının klinik özellikleri (n=8) [23] 63
Tablo 6. 2022 ACR/EULAR sınıflandırma kriterlerine göre granülomatöz polianjitis hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri (n=8) [190] 64
Tablo 7. Nötrofil kültür üst sıvıları ve serum NETosis belirteçleri arasındaki korelasyon analizi..... 99

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Periferik kandan düşük dansiteli nötrofillerin Ficoll yoğunluk gradyanı yöntemi ile ayrıştırılmasının şematik gösterimi (yazar tarafından oluşturulmuştur)..... 12
Şekil 2. NET oluşum mekanizmaları (Li ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır)[87]. 21
Şekil 3. Düşük dansiteli nötrofillerin izolasyonunda kullanılan MojoSort™ manyetik ayırma cihazı (BioLegend). 55
Şekil 4. Uyarımsız, PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının nötrofil canlılığına etkileri. 66
Şekil 5. Uyarımsız, PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının nötrofil NETosis ekspresyonuna etkisi..... 67
Şekil 6. Nötrofil fonksiyonlarına PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının etkisi..... 68
Şekil 7. Nötrofil alt gruplarında PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının ROS üretimine etkilerinin hastalık gruplarında analizi. 70
Şekil 8. Tüm hasta gruplarında nötrofil alt gruplarının farklı uyaranlara ROS yanıtları 72
Şekil 9. Hastalık alt gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteçlerinin ekspresyonları. 75
Şekil 10. Normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis ekspresyonları..... 76
Şekil 11. Tüm hasta gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde PSV-23 aşı ve PMA uyarımları sonrası sitH3, MPO ve $sitH3^{+}$+MPO^{+} ekspresyonlarının incelenmesi 78
Şekil 12. Apoptotik indeksin nötrofil alt gruplarında akan hücre ölçer analizi..... 79
Şekil 13. Apoptotik indeks akan hücre ölçer analizleri 80
Şekil 14. Nötrofil alt gruplarında farklı uyaranların hastalık gruplarında apoptotik indeks ve canlılık oranlarına etkisi 83
Şekil 15. Nötrofil alt gruplarında farklı uyaranların hastalık gruplarında apoptotik indeks ve canlılık oranlarına etkisi 85
Şekil 16. Farklı uyarımların normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteci olarak MPO ekspresyonuna etkisi. 86
Şekil 17. Behçet hasta grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının MPO ekspresyonu üzerine etkilerinin konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi. 87
Şekil 18. Farklı uyarımların normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteci olarak MPO ekspresyonuna etkisi. 88
Şekil 19. NE, PAD4, MPO ve citH3 ELISA kitlerine ait standart eğriler..... 89

Şekil 20. Hastalara ait serum örneklerinde citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri 90
Şekil 21. Normal ve düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri 92
Şekil 22. Tüm hastalık gruplarında nötrofil kültür üst sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri 95
Şekil 23. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit'e ait standart eğri 96
Şekil 24. Hücresiz çift zincirli serbest DNA (cf-dsDNA) analiz grafikleri..... 98
Şekil 25. CRP düzeyleri ile PMA ve PSV-23 uyarımlı normal dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki MPO düzeyleri arasındaki korelasyon..... 100
Şekil 26. CRP düzeyleri ile uyarımsız, PMA ve PSV-23 uyarımlı düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki MPO düzeyleri arasındaki korelasyon 101
Şekil 27. CRP düzeyleri ile uyarımsız, PMA ve PSV-23 uyarımlı düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki NE düzeyleri arasındaki ilişki 102

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAV: ANCA ilişkili vaskülit

ACR: Amerikan Romatoloji Koleji

ANCA: Anti nötrofil sitoplazmik antikor

aPLA: Antifosfolipid antikorlar

APRIL: Proliferasyon indükleyici ligand

APS: Antifosfolipid sendromu

aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

BAFF: B hücre aktive edici faktör

BCL-2: B hücreli lenfoma-2

BDCAF: Behçet hastalığı güncel aktivite formu

BH: Behçet hastalığı

BMI: Beden kitle indeksi

BVAS: Birmingham vaskülit aktivite skoru

BVAS/ GPA: Granülomatöz polianjitis için Birmingham vaskülit aktivite skoru

c-ANCA: Sitoplazmik antinötrofil sitoplazmik antikor

CCL: Kemokin ligandı

CD: Farklılaşma kümesi

cf-dsDNA: Hücre dışı çift sarmallı DNA

CHCC: Chapel Hill konsensus konferansı

CRP: C-reaktif protein

CXCL: C-X-C motifli kemokin ligandı

CXCR: C-X-C motifli kemokin reseptörü

DAMP: Hasar ilişkili moleküler örüntüler

DCFH-DA: 2',7'-Diklorodihidrofloresein diasetat

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EGPA: Eozinofilik granülomatöz polianjitis

ELISA: Enzim bağlantılı immünosorbent test

ERAP-1: Endoplazmik retikulum ilişkili aminopeptidaz-1

EULAR: Avrupa Romatizma ile Mücadele Birliği

FBS: Fetal dana serumu

G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör

GPA: Granülomatöz polianjitis

GPX4: Glutatyon peroksidaz-4

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları

HLA: İnsan lökosit antijeni

ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1

ICAM-2: Hücreler arası adezyon molekülü-2

ICBD: Uluslararası Behçet hastalığı kriterleri

IF: İmmünfloresan

IFN- γ: İnterferon gamma

IL: İnterlökin

ILC2: Tip 2 doğal lenfoid hücre

IRF8: İnterferon düzenleyici faktör 8

ISG: Uluslararası çalışma grubu

ISTH: Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği

LA: Lupus antikoagülanı

LDN: Düşük dansiteli nötrofil

LDG: Düşük dansiteli granülosit

LFA-1: Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1

LPS: Lipopolisakkarit

MAC-1: Makrofaj antijen kompleksi-1

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

MEFV: Ailevi Akdeniz Ateşi geni

MEM: Minimum esansiyel besiyeri

MFI: Ortalama floresans şiddeti

MHC: Büyük doku uyumluluk kompleksi

MPO: Miyeloperoksidaz

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)

NE: Nötrofil elastaz

NET: Nötrofil ekstrasellüler tuzak

NETosis: Nötrofil ekstrasellüler tuzak oluşumu

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NK: Doğal öldürücü hücre

NLRP3: NOD benzeri reseptör ailesi pirin domeni içeren protein 3

NOD2: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domeni içeren protein 2

NOT: Normal dansiteli nötrofil

OD: Optik yoğunluk

PAD4: Peptidil arjinin deiminaz 4

PAR: Proteaz aktive reseptör

PBMC: Periferik kan mononükleer hücre

PBS: Fosfat tamponlu salin

PI: Propidyum iyodid

PMA: Forbol miristat asetat

PR3: Proteinaz-3

PRR: Patern tanıma reseptörleri

PSV-23: 23 valanlı Pnömokok polisakkarid aşı

RNA: Ribonükleikasit

ROS: Reaktif oksijen ürünleri

SitH3: Sitrülinlenmiş histon H3

SLE: Sistemik lupus eritematozus

STAT4: Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 4

sTNF-α: Çözünür form tümör nekroz faktör alfa

TACE: TNF-α dönüştürücü enzim

TH: Yardımcı T hücre

TLR: Toll benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktör

TNFR1: Tümör nekroz faktörü reseptörü 1

Treg: Regülatör T hücresi

VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

VT: Vasküler tromboz

vWF: von Willebrand faktör

ÖZET

Çetin Ç. Vasküler Tutulumlu Behçet Hastalığı ve Diğer Romatolojik Hastalıklarda NETosis'in Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2026.

Çalışmamızda yeni tanı almış, tedavi naif ve vasküler tromboz ile başvuran Behçet hastalarında normal dansiteli ve düşük dansiteli nötrofil alt gruplarında nötrofil aktivasyonu, reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretimi ve NETosis yanıtlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Vasküler Behçet hastalığındaki nötrofil yanıtının vaskülitik ve trombotik hastalıklardan farklılaşan yönlerini ortaya koyabilmek amacıyla karşılaştırma grupları olarak yeni tanı aktif granülomatöz polianjitis, vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu ve idiyopatik vasküler tromboz hastaları değerlendirilmiştir.

Periferik kandan yoğunluk temelli ayrıştırma yöntemi ile normal dansiteli ve düşük dansiteli nötrofil alt grupları izole edildi. Düşük dansiteli nötrofillerin yüksek saflıkta izole edilebilmesi için manyetik negatif seleksiyon yöntemi uygulandı. Ardından nötrofiller, klasik bir kimyasal uyaran olan forbol miristat asetat (PMA) ve mikrobiyal uyarıyı taklit eden 23-valanlı pnömokok polisakkarid aşı antijeni (PSV-23) ile uyarıldı. ROS düzeyleri, sitrülinlenmiş histon H3 (citH3), miyeloperoksidaz (MPO) ve MPO^{+}/$citH3^{+}$ NETosis belirteçleri akan hücre ölçer yöntemiyle değerlendirildi. Serum ve nötrofil kültür üst sıvılarında NET ilişkili belirteçler (citH3, MPO, NE, PAD4) ELISA, cf-dsDNA ise fluorometrik yöntemle değerlendirildi.

Bulgular, vasküler trombotik Behçet hastalığında özellikle düşük dansiteli nötrofil alt grubunda belirgin olmak üzere artmış ROS üretimi ve NETosis yanıtı olduğunu göstermiştir. Bu artışın özellikle PSV-23 uyarısı sonrası daha belirgin olması, Behçet hastalarında nötrofillerin mikrobiyal uyaranlarla kolay uyarılabilir, düşük uyarılma eşiğine sahip ve aşırı aktive bir fenotip sergilediğini düşündürmüştür.

Verilerimiz, yeni tanı vasküler tutulumlu Behçet hastalarında özellikle düşük dansiteli nötrofillerde belirginleşen NETosis yanıtının diğer vaskülitik ve trombotik hastalıklardan ayrışan özgün bir tromboinflamatuvar süreç ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı, vasküler tromboz, nötrofil ekstrasellüler tuzakları, düşük dansiteli nötrofil, granülomatöz polianjitis

Bu çalışma, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32568

ABSTRACT

Çetin Ç. The role of NETosis in Behçet’s disease with vascular involvement and other rheumatologic diseases. İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology. PhD Thesis. İstanbul. 2026.

This study aimed to evaluate neutrophil activation, reactive oxygen species (ROS) production, and NETosis responses in normal-density and low-density neutrophil subgroups of newly diagnosed, treatment naive Behçet’s disease patients presenting with vascular thrombosis. To distinguish the neutrophil response in vascular Behçet's disease from other vasculitic and thrombotic conditions, patients with newly diagnosed active granulomatosis with polyangiitis, vascular thrombotic primary antiphospholipid syndrome, and idiopathic vascular thrombosis were included as comparison groups.

Normal-density and low-density neutrophil subgroups were isolated from peripheral blood using a density-based separation method. Magnetic negative selection was applied to isolate low-density neutrophils with high purity. Neutrophils were then stimulated with phorbol myristate acetate (PMA), a classic chemical stimulant, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine antigen (PSV-23), mimicking microbial stimulation. ROS levels, citrullinated histone H3 (citH3), myeloperoxidase (MPO), and MPO+/citH3+ NETosis markers were evaluated by flow cytometry. NET-related markers (citH3, MPO, NE, PAD4) in serum and neutrophil culture supernatants were assessed by ELISA, while cf-dsDNA was measured fluorometrically.

Findings revealed increased ROS production and NETosis response in vascular thrombotic Behçet's disease, particularly in the low-density neutrophil subgroup. This increase, particularly marked following PSV-23 stimulation, suggested that Behçet's neutrophils exhibit a highly primed, low-activation-threshold, and hyperactivated phenotype toward microbial stimuli

Our findings support that the enhanced NETosis response, particularly within low-density neutrophils of newly diagnosed vascular Behçet's patients, may be associated with a distinct thromboinflammatory process that differentiates it from other vasculitic and thrombotic diseases.

Key Words: Behçet’s disease, vascular thrombosis, neutrophil extracellular traps, low-density neutrophils, granulomatosis with polyangiitis

The present work was supported by the Health Institutes of Türkiye (TUSEB). Project No. 32568

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik dolaşımda lökositlerin sayısal olarak baskın grubunu oluşturan nötrofiller, enfeksiyon varlığında hızla inflamasyonun olduğu alanlara göç ederek doğal bağışıklığın erken faz yanıtını gösterirler. Nötrofiller akut inflamasyon sırasında konak savunma görevlerini yerine getirirken fagositoz, granül içereriklerinin salınması, reaktif oksijen ürünlerinin oksidatif patlama yolu ile oluşturulması, sitokinlerin ve antimikrobiyal peptidlerin üretimi ve nötrofil ekstrasellüler tuzaklarının (NET) oluşumu gibi işlevsel mekanizmaları kullanmaktadır [1, 2]. NETosis, nötrofillerin gevşetilmiş kromatin yapılarını ve sitoplazmik granül içeriklerini hücre dışına salarak NET yapılarının oluşumu ile karakterize, klasik hücresel ölüm mekanizmalarından farklı özellikler sergileyen özel bir hücresel yanıt süreci olarak tarif edilmektedir [3-5].

NETosis süreci başlangıçta enfeksiyöz etkenlere karşı doğal bağışıklığın yerine getirdiği bir savunma hattı olarak görülmüş olmasına rağmen, günümüzde enfeksiyon dışındaki çok sayıda inflamatuvar durumda rol aldığı düşünülmektedir. Otoimmün hastalıklar, tümör gelişimi ve immün yanıtı, transplantasyon immünolojisi, gebelik komplikasyonları ve trombotik olaylar bu süreç ile ilişkilendirilen başlıca klinik durumlar arasında yer almaktadır [6-13].

NETosis, vaskülitlerin patogenezinde gerçekleşen inflamatuvar olaylar örgüsünde önemli bir rol üstlenirken aynı zamanda damar endotel hasarı ve tromboz gelişim süreçlerinde de merkezi bir yere sahiptir. Nötrofil hakimiyeti olan vaskülitlerde artmış nötrofil aktivasyonu sonucu ortaya çıkan, içeriğinde nükleik asit yapıları, histon ve granüler proteinler bulunduran NET oluşumları doku düzeyinde hasara yol açarken otoantijenlerin immün sistem hücrelerine sunumunu sağlayarak verilen immün cevabı güçlendirir [14, 15]. NET'ler ağ benzeri yapıları sayesinde eritrositlerin ve trombositlerin tutunabileceği uygun bir zemin oluşturur. Ayrıca trombositlerin adezyonunu, doku faktörü sentezlenmesini ve oksitlenmiş fibrin oluşumunu arttırarak güçlü vasküler trombüs oluşumunu sağlarken, aynı zamanda içeriğindeki proteolitik enzimler sayesinde doğal antikoagülan özelliğe sahip proteinlerin yıkımına yol açarak ve endotel hücrelerine doğrudan etki ederek damar duvarında kalıcı hasar gelişimi ile tromboz oluşumunda önemli bir rol üstlenir [16-20].

Çalışmamızda yeni tanı konulmuş, tedavi başlanmamış vasküler tromboz ile başvuran Behçet hastalığı ana hasta grubumuzu temsil etmekte olup, bu hasta grubunda gözlenen nötrofil aktivasyonu ve NETosis yanıtlarının, normal dansiteli ve düşük dansiteli nötrofil alt gruplarında ayrıntılı olarak incelenmesi, özellikle düşük dansiteli nötrofillerin farklı uyarılara verdikleri yanıtların değerlendirilmesi sağlanarak bu nötrofil alt grubunun hastalık patogenezindeki yerinin ve öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, nötrofillerin güçlü bir kimyasal uyaran olan klasik forbol miristat asetat (PMA) uyarısı dışında mikroorganizmalara ait yapıların uyarımını taklit eden 23-valanlı pnömokok polisakkarid aşı (PSV-23) antijeni ile uyarımları sonrası gelişen NETosis yanıtlarının değerlendirilerek; Behçet hastalığında nötrofillerin özellikle fizyolojik olarak daha anlamlı kabul edilebilecek mikrobiyal uyarılara karşı gösterdiği aşırı yanıtın ve bunun düşük dansiteli nötrofillerdeki belirginliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Behçet hastalığında hastalık şiddetinin belirlenmesinde, özellikle vasküler tutulumu olan hastalarda hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde klinik pratiğe uyumlu hale getirilmiş güvenilir bir biyokimyasal belirteç henüz tanımlanmamıştır. Doğal immünitenin aktif olduğu, nötrofil aktivitesinin ve nötrofillerden sitokin ve kemokin salınımının yüksek olduğu bu hastalıkta tanısal aşamada nötrofillerin çeşitli uyarılara yanıt olarak aşırı aktivasyonundan yararlanılarak deri Paterji testi kullanılmaktadır [21-24]. Ancak uygulanan testin geniş bir aralıkta değişen pozitiflik oranı, hastaların önemli bir kısmında testin negatif sonuç vermesi bu alanda gerekli ihtiyaçları karşılayamamaktadır [25, 26]. Bu açıdan, nötrofil alt gruplarında farklı uyarım koşullarında elde edilen reaktif oksijen ürünleri ve NETosis ilişkili belirteçlerin düzeylerinin değerlendirilmesi, NETosis belirteçlerinin ölçümünde akan hücre ölçer yöntemi ve ELISA temelli ölçümlerin birlikte kullanılmasının bu alandaki eksiklikleri gidermeye katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Son olarak, elde edilen bu nötrofil aktivasyonu ve NETosis yanıtlarının nötrofil aracılı bir diğer vaskülit olan yeni tanı, aktif granülomatöz polianjitis, immün aracılı tromboz grubu olarak vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu ve romatolojik hastalık olmaksızın gelişen vasküler tromboz grupları ile karşılaştırılması yoluyla, Behçet hastalığında tromboz gelişimine eşlik eden nötrofil yanıtının, diğer inflamatuvar

ve trombotik hastalıklardan hangi yönleriyle farklılıklar sergilediğinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nötrofil Gelişimi

Kemik iliğinde bulunan $CD34^+$ hematopoietik kök hücreler, miyeloid farklılaşma hattı aracılığıyla granülosit serisinin oluşumunu başlatarak nötrofillerin gelişimini sağlar. Bu süreçte hematopoietik kök hücreler öncelikle ortak miyeloid öncül hücrelere farklılaşır ardından granülosit makrofaj öncül hücreleri üzerinden, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve diğer hematopoietik büyüme faktörlerinin etkisiyle ilerleyen bu süreçte hücreler ardışık olgunlaşma evrelerinden geçer. Gelişimin erken dönemlerinde yer alan öncül hücreler ile periferik dolaşıma katılan olgun nötrofiller arasında çekirdek yapısı, sitoplazmalarında yer alan granül içerikleri, protein ekspresyon profilleri ve proliferatif kapasite açısından belirgin farklılıklar bulunmaktadır [27, 28].

Miyeloid progenitörlerin farklılaşmasını, nötrofil öncüllerinin proliferasyonunu ve olgun hücrelerin kemik iliğinden dolaşıma salınmasını düzenleyen granülopoez sürecinin en önemli uyarıcı aktörü granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) olmakla birlikte farklı sitokinler de bu süreci destekleyebilmektedir. G-CSF üretimi IL-23/IL-17 ekseni aracılığıyla düzenlenir. Özellikle γδ T hücreleri ve doğal öldürücü T hücrelerinden salınan IL-17 bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Dendritik hücreler ve dokularda bulunan makrofajlar tarafından salınan IL-23 üzerinden IL-17A üretiminin denetimi sağlanmaktadır. Granülopoez oldukça iyi kontrollü bir basamaklar serisi olup, kemik iliğinde üretilen olgunluğunu tamamlamış nötrofiller CXCR2 aracılı sinyal mekanizmaları vasıtasıyla periferik dolaşıma katılır. Enfeksiyon veya akut inflamatuvar durumlar gibi stres anlarında birseysel ihtiyaçlara göre nötrofil üretiminde kayda değer bir artış gerçekleştirilerek, immatür nötrofil formlarının dolaşıma katılımı sağlanabilmektedir [29, 30].

Nötrofiller fizyolojik koşullarda kısa yaşam siklusuna sahip hücrelerdir. Dolaşımda sınırlı bir süre bulunan bu hücreler daha sonra karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi dokulara yönelerek burada programlanmış hücre ölümü sürecine girmektedir. Apoptoz sırasında nötrofillerde hücresel düzeyde gerçekleşen morfolojik değişiklikler ile hücre membran bütünlüğü korunurken, granüllerde yer alan proteolitik enzimlerin çevre dokulara kontrolsüz şekilde salınmasının önüne geçilir. Apoptotik nötrofillerin

makrofajlar tarafından inflamatuvar yanıt oluşturmadan fagosite edilmesi *"efferositoz"* olarak adlandırılır ve inflamasyonun kontrollü biçimde sonlandırılmasında önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir [31]. Nötrofil temizlenmesinin tek bir organ yada doku tarafından yönetilmeyip, vücudun farklı anatomik bölgelerinde gerçekleşebildiği ortaya konulmuştur. Örnek vermek gerekirse nötrofiller inflamasyon sırasında deri ve üriner sistem gibi dış ortamla temas eden bölgelerde elimine edilebildiği gibi, ağız boşluğu ve gastrointestinal sistem de bu sürece katkıda bulunabilmektedir. Kemik iliğinin, özellikle CXCR4 aracılı geriye doğru göç mekanizması üzerinden, dolaşımdaki nötrofillerin önemli bir bölümünün uzaklaştırılmasında görev aldığı düşünülmektedir [29].

Biyolojik olarak nötrofillerin doğru tarif edilebilmesi için tek tek hücre bazında değerlendirilmesi yerine farklı kompartmanların biraraya gelmesi ile ortaya çıkan fonksiyonel etkinin değerlendirilmesi üzerinde durulmaktadır. Primer lenfoid organlardaki öncül hücrelerden gelişip olgun nötrofilleri oluşturan maturasyon aşamalarındaki hücrelerin uzun ömürlü, çoğalma kapasitesi yüksek, özgün yüzey göstergeleri olan hücrelerden oluştuğu, diğer taraftan matür nötrofillerin kısa ömürlü, mitotik aktivite göstermeyen, kısa etki süreli hücrelerden oluştuğu bilinmektedir. Bu durum farklı klinik antitelerde ve tedavi seçim süreçlerinde hedef hücre kompartmanının hangisi olacağına karar verilmesinde dikkate değer bir noktayı oluşturmaktadır [32].

2.1.1. Nötrofillerin Morfolojik Özellikleri ve Granüler Yapısı

İnsanlarda dolaşımdaki lökositlerin %50–70'ini meydana getiren nötrofiller, hücre büyüklüğü olarak ortalama 12-15 µm çapında olup, polimorfonükleer çekirdek yapısı ile karakterizedir. Nötrofillerin uzun yıllar boyunca dolaşımda 6-8 saat civarında oldukça kısa süre yaşayan hücreler olduğu kabul edilirken zaman içerisinde gerçekleştirilen başka çalışmalarda, dolaşımdaki yaşam süresinin daha uzun olabileceği görüşü üzerinde durulmuştur [33].

Çok sayıda granül ve sekretuar vezikül içeren sitoplazmalarındaki yapılar, nötrofillerin antimikrobiyal ve inflamatuvar yanıtlarında görev alan enzimler, proteazlar ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin depolandığı temel hücresel kompartmanları oluşturmaktadır [34]. Nötrofillerin sitoplazmasında yer alan granüler yapılar, kemik iliğinde gerçekleşen diferansiyasyon süreci boyunca kademeli olarak oluşur ve hücrenin

efektör fonksiyonlarını belirleyen temel yapılardan biridir. Bu granüller, oluşum zamanları, içerdikleri protein bileşenleri ve gösterdikleri biyolojik etkinliklere göre temelde dört alt gruba ayrılmaktadır. Primer (azurofilik) granüller miyeloperoksidaz, proteinaz 3, nötrofil elastaz, katepsin G ve defensinler gibi güçlü mikrobisidal proteolitik molekülleri içermeleri nedeniyle patojen eliminasyonunda önemli rol oynar. İlerleyen maturasyon evrelerinde oluşan sekonder granüller lizozim, laktoferrin gibi demir bağlayıcı proteinler, kollajenaz ve NGAL gibi molekülleri barındırırken, tersiyer granüller ise jelatinaz ve matriks metalloproteinaz-9 gibi enzimler aracılığıyla ekstrasellüler matriksi parçalayarak nötrofillerin inflamasyon bölgesine hareket etmesine katkıda bulunur. Sekretuvar veziküller granül matriks proteinlerinden çok yüzey molekülleri ve hücresel etkileşimde görevli yapılar açısından zengin olup, nötrofil aktivasyonu sonrasında adezyon, endotel teması ve inflamasyon alanlarına göç süreçlerinde görev almaktadır. Nötrofil granülleri arasında en hızlı mobilize olabilenleri sekretuvar veziküller iken, azurofilik granüller daha kuvvetli inflamatuvar uyarılar sonrasında en geç salınan grubu oluşturmaktadır [35]. Granül proteinlerinin sentezi ve depolanması, nötrofil gelişimi sırasında aktif hale gelen çeşitli transkripsiyon faktörleri ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bu düzenleyici mekanizmalar hücrenin antimikrobiyal ve inflamatuvar fonksiyonlarının kazanılmasında kritik öneme sahiptir [36].

Nötrofiller tarafından üretilen çeşitli serin proteazların (proteinaz-3, nötrofil elastaz vb) enzimatik aktivitesi, salınan inflamatuvar mediyatörlerlerin belirli bölgelerinden kesilmesini sağlayarak bunların biyolojik etkinliklerini ve işlevlerini etkileyebilmektedir. Somut bir örnek vermek gerekirse IL-1 ailesine üye sitokinlerin pekçoğu aktif olmayan formda sentezlenip ilgili reseptörlerine bağlanabilmek için proteolitik aktivasyon geçirir. Bu doğrultuda proteinaz-3, nötrofil elastaz gibi nötrofil granül enzimleri IL-1α ve IL-33 ve IL-36 alt grupları üzerinde etki göstererek tip 2 doğal lenfoid hücrelerin (ILC2) aktivasyonunu sağlayabilmekte ve bu hücrelerde IL-6 ve IL-8 üretimini arttıran proinflamatuvar etkileri güçlendirebilmektedir [37].

2.1.2. Nötrofillerin Efektör Fonksiyonları

Nötrofiller ürettikleri çeşitli sitokinlerin ve mediyatörlerin proinflamatuvar ve immün düzenleyici etkileri sayesinde bağışıklık yanıtlarının şekillenmesinde etkili bir şekilde rol oynamaktadır. Aktivasyon sonrasında hem insan hem de mürin

nötrofillerinin çok sayıda proinflamatuvar (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-17, IL-18 vb), antiinflamatuvar (IL-1RA, IL-10 vb), immün yanıt düzenleyici (IFN- α, IFN-γ, IL23 vb) sitokin ve kemokini (CXCL1-3, CXCL8/IL-8, CXCL9, CCL2, CCL20 vb) üretme ve salgılama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin bir kısmı üretildikten sonra hücre içi depolarda muhafaza edilip, akut uyarılara yanıt olarak hızlıca ortama salınmaktadır. Geniş sitokin ve kemokin üretim potansiyeli sayesinde nötrofiller diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin (dendritik hücreler, makrofajlar, T ve B hücreleri) inflamasyon bölgesine yönlendirilmesini, aktivasyonunu ve fonksiyonel farklılaşmasını düzenleyerek hem doğal hem de adaptif immün yanıtların koordinasyonunda kilit bir görev üstlenmektedir [38, 39]. İnflamatuvar olaylar sırasında üretimi artan granülosit koloni uyarıcı faktör düzeyleri de nötrofillerin kemik iliğinden dolaşıma geçmesini sağlayan kemokin uyarıcı sinyalleri arttırarak bu sürece katkı sunmaktadır [40].

Nötrofiller inflamasyon bölgesine ulaşabilmek için damar endoteli ile dinamik etkileşimler içeren çok basamaklı ve sırasıyla tutunma, yuvarlanma (rolling), yavaş yuvarlanma, durma, adezyonun güçlenmesi, damar yüzeyi boyunca ilerleme ve endotelden dokuya geçiş basamaklarını içeren bir göç rotası izlemektedir. İnflamasyon alanında bulunan lökositlerin salgıladığı inflamatuvar mediyatörler (sitokinler, lökotrienler), histamin gibi vazoreaktif değişikliklere yol açan çözünür mediyatörlerin damar endotel hücrerinde meydana getirdiği değişiklikler beyaz kan hücrelerinin olayın olduğu bölgelere çağrılma sürecinin tetiğini çeker. İlk temas genellikle endotelyal hücrelerde eksprese edilen selektinler (P-selektin, E-selektin) ile nötrofiller üzerindeki ligandların etkileşimi aracılığıyla gerçekleşir ve bu etkileşim hücrelerin damar duvarı boyunca yuvarlanarak hareket etmesine olanak sağlar. Bu esnada endotel hücre yüzeylerinde sunulan kemokinler ve selektin aracılı sinyaller nötrofillerde integrin aktivasyonunu başlatan hücre içi mekanizmaları tetikler. Aktive olan lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 (LFA-1) ve makrofaj antijen kompleksi-1 (MAC-1, CD18/CD11b) integrinlerin, endotelyal hücrelerde bulunan ICAM-1 ve ICAM-2 gibi adezyon molekülleri ile etkileşime girmesi nötrofillerin damar duvarına sıkı şekilde bağlanmasını sağlar. Daha sonra hücreler endotelyal yüzey boyunca ilerleyerek burayı geçerek inflamasyon bölgesine göç eder [29, 41].

İnflamasyon odağına ulaşan nötrofiller burada aktive olarak bazı efektör fonksiyonları yerine getirmektedir. Bu aşamada granül içeriklerinin (laktoferrin, lizozim, katepsinler vb) mobilizasyonu ile gerçekleşen degranülasyon süreci, fagolizozomlar içerisinde serin proteazlar ve NADPH oksidaz sisteminin devreye girmesi sonucunda reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretiminin gerçekleştiği oksidatif patlama sayesinde mikrobik etkenlerin ortadan kaldırılmasını sağlayan fagositoz ve nötrofil ekstrasellüler tuzak (NET) oluşum süreçlerini kapsamaktadır. Bu süreçlerin hepsi enfeksiyöz patojenlere karşı nötrofillerin önemli bir vücut savunma fonksiyonunu yerine getirmesini sağlamaktadır [2, 42]. NADPH oksidaz aktivitesindeki bozuklukların kronik granülomatöz hastalıkta yaşamı tehdit edebilen enfeksiyonlarla ilişkili olması ROS aracılı oksidatif mekanizmanın önemini desteklemektedir [43]. Ancak bu durumun istenmeyen etkilerinin olabileceğini de gözardı etmemek gerekmektedir. Öyle ki aşırı ve kontrol altına alınamamış nötrofilik savunma yanıtları sırasında fazla miktarlarda üretilen reaktif oksijen ürünleri çevre dokularda tahribat oluşturarak, inflamasyonun kuvvetlenerek devam etmesine yol açabilmektedir [44].

Nötrofillerin fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesinde akan hücre ölçer yöntemi, hücrelerin yapısal ve biyolojik özelliklerini tek hücre düzeyinde değerlendirip, aynı anda çok sayıda parametreyi analiz edebildiği için yaygın olarak kullanılan bir araştırma yöntemidir. Lazer ışını ile uyarılan hücrelerden elde edilen ışık saçılımı ve floresan sinyallerinin ölçülmesi yoluyla araştırılan moleküllerin hem hücrenin içerisinde hem de hücrenin yüzeyinde ekspresyon düzeyleri incelenebilmektedir. Nötrofil fonksiyonlarının incelenmesinde akan hücre ölçer yöntemi ile granül içeriklerinin salınımı, fagositoz kapasitesi, oksidatif patlama ve hücresel yaşam döngüsü gibi birçok süreç değerlendirilebilmektedir. Floresan işaretli partiküller veya mikroorganizmalar kullanılarak fagositik aktivite ölçülebilirken, granül membran proteinlerinin yüzey ekspresyonundaki değişiklikler degranülasyonun göstergesi olarak analiz edilebilmektedir. Hücre içi floresan problar yardımıyla ROS oluşumu saptanabilirken nötrofillerin oksidatif yanıt kapasitesi ortaya konulabilmektedir. Bunların dışında hücre membranındaki ve DNA yapısındaki değişikliklerin belirlenmesi ile apoptoz sürecine ilişkin değerlendirmeler yapılabilmektedir [45].

İmmün yanıtlar açısından nötrofiller ürettikleri ve salınımını gerçekleştirdikleri reaktif oksijen ürünleri, sitokinler, büyüme faktörleri ve NET aracılığıyla hem doğal

hem edinilmiş immün sistem yanıtları açısından önemli bir yere sahiptir. Nötrofiller ve NET oluşumları dendritik hücrelerin profesyonel antijen sunan hücre görevlerini güçlendirirken, makrofajlar tarafından proinflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırır [37]. Kemik iliğindeyken nötrofillerin makrofajlar ile etkileşimleri başlamaktadır. Makrofajların ürettiği G-CSF nötrofil üretimini uyarırken, yine bu hücreler tarafından üretilen CXCL12 kemokin uyarısı nötrofillerin kemik iliğinde kalabilmelerinde CXCL1, CXCL2 ve MCP-1 gibi moleküller de nötrofillerin inflamasyonun olduğu doku ve organlara çekilebilmesinde rol oynar. Bu döngü karşılıklı olup aynı şekilde nötrofiller tarafından salınan bazı granül içerikleri de inflamatuvar tipte makrofaj yanıtlarını ve bu hücrelerin fagositoz yeteneklerini arttırmaktadır [42].

Salgıladıkları sitokinlerle birlikte nötrofiller, adaptif immün sistem mekanizmalarını hem T hücre hem B hücre yanıtları açısından etkileyerek T hücrelerinin farklılaşma yönünü ve baskın olarak sergilediği sitokin yanıtlarını, B hücrelerinin çoğalma ve antikor oluşturma süreçlerini etkilemektedir [37]. Çalışmalarda nötrofillerin inflamasyonun gerçekleştiği dokularda yüksek miktarlarda üretilen B hücre aktive edici faktör (BAFF) ve proliferasyon indükleyici ligand (APRIL) gibi sitokinlerin oluşumunda rol üstlenerek, B hücrelerinin yaşamını ve romatoid artrit gibi hastalıklarda otoantikorların oluşum sürecini arttırabileceği gösterilmiştir [39].

2.1.3. Nötrofil Heterojenitesi ve Nötrofil Alt Grupları

Uzun yıllar boyunca nötrofiller, doğal bağışıklık sisteminin fonksiyonel açıdan birbirine büyük oranda benzeyen ve homojen kabul edilen hücreleri olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, son yıllarda gerçekleştirilen moleküler ve fonksiyonel incelemeler, nötrofillerin aslında farklı gen ekspresyon panelleri, yüzey göstergeleri ve biyolojik aktiviteler sergileyen heterojen bir yapılanma içerisinde olduğunu göstermiştir [46].

Tek hücre düzeyinde yapılan RNA analizleri, nötrofillerin gelişim ve işlevsel özelliklerini kazanım aşamalarının, süreklilik ve yenilenme gösteren bir süreç olduğunu göstererek hem fizyolojik şartlarda hem de enfeksiyon durumlarında, kendine özgü moleküler özelliklerle tanımlanan çok sayıda nötrofil alt popülasyonunun bulunduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle kemik iliğinde farklı öncül hücre gruplarından gelişen olgunluk kazanmış nötrofillerin, dolaşıma katıldıktan sonra fonksiyonel açıdan birbirinden ayrı özellikler sergileyen farklı gruplar oluşturabildiği anlaşılmaktadır [28].

Hücrelerin içinde bulundukları doku ortamı ve maruz kaldıkları uyaranlar da nötrofillerin yapısal ve işlevsel çeşitliliği açısından önem taşımaktadır [28, 47].

Deneysel çalışmalar, nötrofil gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan matür ve immatür hücrelerin immün yanıt içerisinde farklı görevleri yerine getirebileceğini göstermektedir. Bu durum, nötrofillerin yalnızca sayısal olarak değil işlevsel açıdan da çeşitlilik gösteren bir hücre topluluğu olduğu yönündeki kanıları desteklemektedir [48].

Nötrofil yaşam döngüsünün nötrofil heterojenitesi açısından önemi büyüktür. Olgunlaşma dereceleri, aktivasyon ve göç durumlarına göre nötrofillerde hem yapısal hem işlevsel farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Olgunlaşmış nötrofiller, önemli miktarda CD10, CD15, CD16, CD62L ve CD66b ekspresyonuna sahip olup, çok parçalı çekirdek yapıları bulunmaktadır. Granülopoez ihtiyacının arttığı akut hallerde kemik iliğinden dolaşıma geçen olgunlaşmamış nötrofillerde CD10 ve CD16 ekspresyonu düşük olup daha çok bant şeklinde parçalı özellik göstermeyen bir çekirdek yapısına sahiptir. Nötrofil aktivasyonu ile CD62L ekspresyonu azalırken, MAC-1 gibi integrinlerin ve CD66b moleküllerinin ekspresyonu artar ki bu durum nötrofillerin biyolojik fonksiyonlarını yerine getirirken kullandıkları çeşitli inflamatuvar sitokinlerin, oksidatif stres yanıtı ile ortaya çıkan ROS üretimini teşvik etmektedir [30].

Nötrofil heterojenitesinin klinik yansımalarına baktığımızda self antijen toleransının kırılması ile ortaya çıkan otoimmün temelli hastalıklarda farklı nötrofil alt gruplarının varlığı göze çarpmaktadır. Otoimmün hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar, özellikle sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında dolaşımda klasik nötrofillerden farklı özellikler taşıyan bazı hücre alt gruplarının bulunduğunu göstermektedir. Bu hücreler düşük dansiteli granülositler olarak tanımlanmakta ve belirgin proinflamatuvar özellikler sergileyebilmektedir. NET oluşumuna artmış yatkınlık gösteren bu hücreler, hücre içeriğinde bulunan DNA ve granüler proteinlerin hücre dışına salınması vasıtasıyla potansiyel otoantijenlerin immün sistemle karşılaşmasına zemin hazırlayabilmektedir. Bu durumun inflamatuvar yanıtın devamlılığına katkıda bulunabileceği ve otoimmün süreçlerin patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir [48, 49].

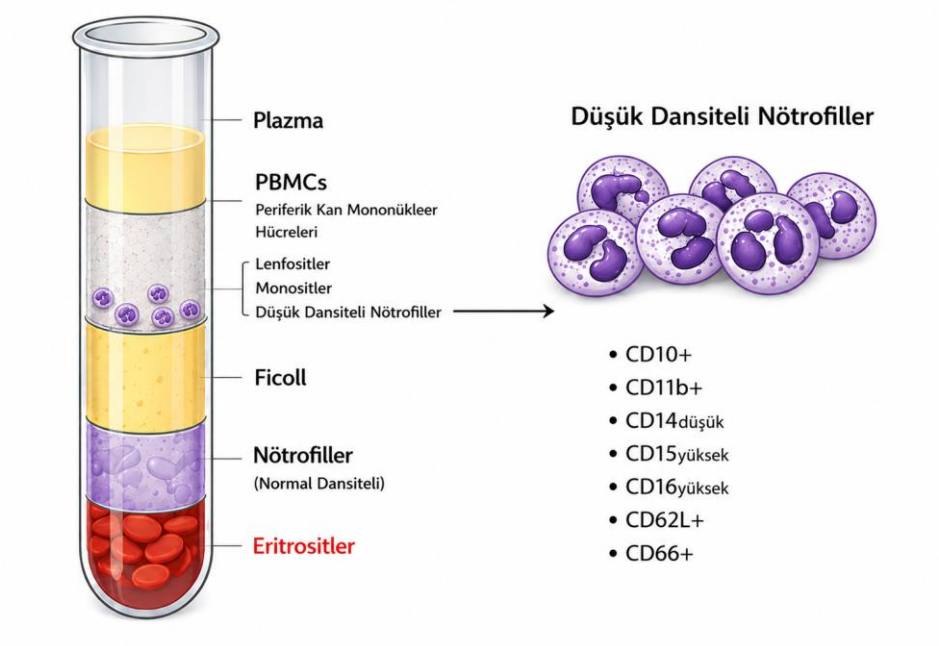
Otoimmün hastalıklarda tanımlanan düşük dansiteli nötrofillerin, klasik nötrofiller ile mukayesesi; inflamatuvar yanıtı güçlendiren TNF-α, IL-17, IFN-α ve IFN

–γ gibi sitokinleri daha yüksek düzeylerde üretebildiğini bunun yanında deneysel çalışmalarda endotelyal hücre bütünlüğünü bozabilecek sitotoksik etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Bu hücrelerin uyarımsız koşullarda bile NET oluşumuna daha yatkın olması, inflamasyonun devamlılığı, doku hasarı ve otoimmün yanıtlar ile ilişkili mekanizmalarda rol oynayabileceğini düşündürmektedir [49, 50].

2.1.3.1. Düşük Dansiteli Nötrofiller

Nötrofiller uzun yıllar boyunca dolaşımda aynı karakterde fiziksel özellikler gösteren bir immün hücre topluluğu olarak değerlendirilmiştir. Ancak 1980'li yıllarda, Pember ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneylerde, sağlıklı bireylerin periferik kanındaki nötrofillerin yoğunluk özelliklerinin birbirinden farklı olabildiği ve bu hücrelerin tek bir yoğunluk katmanında toplanmadığı gösterilmiştir [51]. Nötrofillerin yoğunluk özelliklerine göre ayrıştırılması sırasında tanımlanan bu hücrelerin klasik nötrofillerden farklı davranış sergilediğinin gözlenmesi, nötrofillere ait yeni bir immün hücre alt grubunun tanımlanmasına yol açmıştır.

Periferik kan hücrelerinin Ficoll kullanılarak hücre yoğunluklarına göre santrifüje edilmesi sırasında, sağlıklı bireylerde nötrofillerin ortalama yoğunluklarının lenfositler ve monositler gibi diğer periferik kan hücrelerinden daha yüksek olması nedeniyle, eritrositler ve normal yoğunluk özellikleri taşıyan nötrofiller tüpün alt kısmında toplanırken, mononükleer hücreler ise plazma ile Ficoll yoğunluk ortamı arasındaki ara tabakada kümelenir. Dikkatli bakıldığında bazı nötrofillerin beklenen yoğunluk davranışını göstermeyerek bu ara tabakada mononükleer hücrelerle birlikte yer aldığı görülmüş ve bu hücreler düşük yüzdürme yoğunlukları nedeniyle düşük dansiteli nötrofiller olarak tanımlanmıştır. İzolasyon sonrası düşük dansiteli nötrofiller periferik kan mononükleer hücre tabakasında bulunan ve akan hücre ölçer çalışmalarında genellikle $CD15^{+}$, $CD16^{+}$ ve düşük CD14 ekspresyonu ile karakterize edilen granülositer seri hücreleri olarak kabul edilmektedir [52] (Şekil 1).



Şekil 1. Periferik kandan düşük dansiteli nötrofillerin Ficoll yoğunluk gradyanı yöntemi ile ayrıştırılmasının şematik gösterimi (yazar tarafından oluşturulmuştur).

Periferik kanda bulunan düşük dansiteli nötrofiller sağlıklı bireylerde oldukça küçük bir hücre grubunu temsil eder ve yoğunluk temelli ayrıştırması sonrasında periferik kan mononükleer hücre tabakasında düşük oranlarda tespit edilir. Çeşitli çalışmalarda bu hücrelerin PBMC içindeki oranının genellikle birkaç yüzde ile sınırlı olduğu ve yaklaşık %5 civarında bildirildiği paylaşılmaktadır. Morfolojik incelemelerde sağlıklı bireylerden elde edilen düşük dansiteli nötrofillerin çoğunlukla segmentli çekirdek yapısına sahip olduğu ve klasik nötrofillerle benzer granüllü yapıda sitoplazmik özellikler gösterdiği görülmüştür. Yüzey belirteçleri incelendiğinde bu hücrelerin $CD10^{+}$, $CD11b^{+}$, $CD14^{düşük}$, $CD15^{yüksek}$, $CD16b^{yüksek}$, $CD62L^{+}$, $CD66b^{+}$ ve $CXCR4^{+}$ gibi olgun nötrofillere özgü belirteçleri taşıdığı, buna karşılık monositlerle ilişkili CD14 yüzey molekülünü taşımadığı gösterilmiştir [53].

Düşük dansiteli nötrofiller morfolojik olarak heterojen bir hücre topluluğu olup, bazı durumlarda daha az segmentli veya bant form çekirdek yapısı ile immatür nötrofillerin özelliklerini gösterirken, bazı durumlarda multilobüler çekirdeğe sahip matür nötrofil morfolojisini devam ettirebilmektedir [54, 55]. Bu hücrelerin fagositoz yeteneklerinin ve reaktif oksijen ürünleri üretiminin yüksek olduğu nötrofiller gibi NET oluşturabildiği görülerek sağlıklı kişilerin kanında düşük dansiteli nötrofillerin az

sayıdaki varlığı ve bu hücrelerin önceden hazır hale geçmiş olgun hücre fenotipine sahip oldukları gösterilmiştir [55]. Bu çerçevede sağlıklılardaki düşük dansiteli nötrofil hücre grubu; matürasyonunu tamamlamamış hücrelerden ziyade, olgun klasik nötrofil hücre grubundan işlevsel olarak farklılaşabilen değişik bir nötrofil alt grubunu temsil edebilmektedir [53].

Farklı yoğunlukta ayrıştırma ortamları kullanıldıktan sonra mononükleer hücre katmanı içerisinde yoğunlaşan düşük yoğunluktaki granülositer hücrelerin bundan sonraki izolasyon süreçlerinde hücre yüzey işaretlerine göre ayırma yada manyetik boncuk temelli yöntemler kullanılabilmektedir. Literatürde düşük dansiteli nötrofil tanımlamasında kullanılan yüzey belirteçleri açısından tam bir standardizasyonun bulunmadığı görülmektedir. Farklı çalışmaların bu hücre alt gruplarını tanımlarken birbirinden ayrı yüzey belirteç panelleri kullanması, sonuçların mukayese edilmesini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte yalnızca yüzey belirteçlerine dayalı tanımlamanın yeterli olmadığı, hücrelerin ayrıştırma sonrasında morfolojik olarak mikroskopik inceleme ile doğrulanması ve fonksiyonel analizlerle ayrıntılı biçimde karakterize edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır [53, 56].

Çeşitli inflamatuvar uyaranlarla (lipopolisakkarit, tümör nekroz faktör, formil peptidler vb) karşılaşan nötrofiller granül içeriklerini hücre dışına salarak degranülasyon sürecine girmektedir. Hücrenin yoğunluk ve yüzey fenotipinde değişikliklere yol açan bu olay nedeniyle düşük dansiteli nötrofillerin ortaya çıkışının, aktive olmuş klasik normal dansiteli nötrofillerin degranülasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir [57].

Normal dansiteli nötrofillerin kısa yaşam sürelerinin aksine, düşük dansiteli nötrofillerin dolaşımda daha uzun süre varlığını sürdürebilen, apoptoza daha dayanıklı hücreler olması bunlarda anti-apoptotik sinyal yolaklarını düzenleyen Bcl-2 gen ailesinin bazı üyelerinin ekspresyonlarının daha düşük olması ve diğer yandan kaspaz ailesine mensup proteinlerin dengesinde bozulma ve değişikliklerin olması ile açıklanabilmektedir. Yaşam süresi uzayan ve inflamatuvar uyaranlara daha uzun süre maruz kalan bu nötrofil alt popülasyonunun, NET oluşumuna daha yatkın bir karakter sergileyebileceği bildirilmektedir [57].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, düşük dansiteli nötrofillerin sadece normal nötrofil heterojenitesinin fizyolojik bir alt bileşeni olmayıp, birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta belirgin şekilde artış gösteren özel bir nötrofil hücre grubunu temsil ettiğini göstermiştir. Özellikle SLE, romatoid artrit, psöriazis, antifosfolipid sendromu, ANCA ilişkili vaskülitler, sepsis, maligniteler, gebelik, obezite, alkolik steatohepatit, ateroskleroz, miyokard enfarktüsü ve diyabet gibi çok sayıda durumda dolaşımdaki düşük dansiteli nötrofil oranının arttığı bildirilmiştir [52, 58-62].

Otoimmün hastalıklarda sayıca artış gösteren düşük dansiteli nötrofillerin işlevsel ve fenotipik özelliklerinin normal dansiteli nötrofillerden ayrışabildiği ve farklı hastalık grupları arasında değişkenlik gösterebildiği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur. Hatta bu ayrışmanın düşük dansiteli nötrofil hücre grubu içerisinde daha belirgin olabileceği gösterilmiştir. Örneğin SLE hastalarında dolaşımdaki düşük dansiteli nötrofillerin arttığı ve bu hücrelerin farklı olgunlaşma düzeylerine sahip alt hücre topluluklarından oluştuğu bildirilmiştir. Mistry ve arkadaşlarının çalışmasında bu hücrelerin CD10 ekspresyonuna göre iki hücresel alt gruba ayrılabildiği gösterilmiş, $CD10^-$ hücrelerin daha immatür özellikler taşıdığı, $CD10^+$ hücrelerin ise daha olgun bir nötrofil fenotipi sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca $CD10^+$ düşük dansiteli nötrofillerde tip I interferon ile ilişkili genlerde artmış transkripsiyon saptandığı ve bu hücrelerin NET oluşumu ve efektör nötrofil fonksiyonları açısından daha belirgin aktivite gösterebildiği ifade edilmiştir. Bu sonuçlar, SLE patogenezinde düşük dansiteli nötrofillerin morfolojik ve işlevsel özellikleri yönünden çeşitlilik gösteren bir nötrofil hücre grubunu oluşturduğunu düşündürmektedir [63].

Benzer şekilde ANCA ilişkili vaskülitlerden granülomatöz polianjitis (GPA) hastalarında düşük dansiteli nötrofillerin artış gösterebildiği bildirilmiştir. Lipka ve arkadaşlarının çalışmasında GPA hastalarında özellikle immatür karakterde ve aktivasyon özellikleri taşıyan düşük dansiteli nötrofil hücre grubunun arttığı ve bu hücrelerde NET yıkımının daha düşük derecede gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerde olgunluk göstergesi CD10 ekspresyonunun azaldığı, aktivasyon göstergesi CD66b düzeylerinin arttığı saptanmıştır [64].

Behçet hastalarında düşük dansiteli nötrofiller ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Murad ve arkadaşlarının çalışmasında Behçet hastalarında düşük dansiteli nötrofil sayısının arttığı ve nötrofillerin *PMA* veya gram negatif çomak

E. coli ile uyarılması sonrasında NET üretiminin arttığı, buna karşın fagositoz ve ROS üretiminin azaldığı bildirilmiştir [65]. Bunun yanı sıra nötrofil alt hücre kümelerinin vasküler inflamasyon ile ilişkisini inceleyen bazı çalışmalarda özellikle SLE hastalarında düşük dansiteli nötrofillerin artmış damar inflamasyonu ve subklinik ateroskleroz ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler, düşük dansiteli nötrofillerin otoimmün hastalıklarda inflamasyonun sürdürülmesi, endotelyal hasarın gelişimi ve tromboinflamatuvar süreçlerin ortaya çıkmasında rol oynayabilecek önemli bir nötrofil alt grubunu oluşturduğunu düşündürmektedir [66].

Düşük dansiteli nötrofillerin artmış inflamatuvar aktivite, oksidatif stres ve endotelyal hasar ile ilişkili özellikler sergilemesi, bu hücrelerin otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle bu hücrelerin nötrofil ekstrasellüler tuzakları oluşturma kapasitesinin artmış olabileceğine ilişkin bulgular, düşük dansiteli nötrofil hücre grubunun inflamasyon ile vasküler hasar arasındaki bağlantıda kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle son yıllarda düşük dansiteli nötrofiller ile NET oluşumu arasındaki ilişki giderek daha fazla araştırılmakta ve NETosis mekanizmasının otoimmün ve vasküler inflamatuvar hastalıkların gelişim süreçlerindeki rolü üzerinde yoğunlaşılmaktadır [49, 53, 67, 68].

2.2. Nötrofil Hücre Ölüm Mekanizmaları

Vücutta nötrofil dengesinin sağlanabilmesi ve kan dolaşımında oldukça kısa süre bulanabilen nötrofillerin dolaşımdaki devamlılığının sürdürülebilmesi açısından primer üretim yeri olan kemik iliğinden süreklilik gösteren bir üretim ve salınım dengesinin kurulmuş olması gerekmektedir. İnflamasyon sırasında aktive olan nötrofiller IL-1β başta olmak üzere çeşitli proinflamatuvar mediyatörlerin etkisiyle daha uzun süre hayatta kalabilmektedir [69]. Apoptoz nötrofillerin başlıca ölüm şekli olmakla birlikte piroptoz, nekroptoz, ferroptoz ve NETosis gibi farklı hücresel ölüm mekanizmalarının bu süreçte rol alabildiği gösterilmiştir. Çeşitli dış uyaranlara yanıt olarak tetiklenen farklı hücresel ölüm yolakları, konağın verdiği inflamatuvar yanıtın özelliklerini belirleme açısından önem taşımaktadır [28, 69].

Apoptoz inflamasyonun eşlik etmediği, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) hücresel yolaklar üzerinden gerçekleşen, kaspaz bağımlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. İntrinsik yolak hücre içi stres uyarıları ile aktive olarak mitokondriyal membran geçirgenliğinde artış ve sitokrom c salınımına yol açarken

ekstrinsik yolak TNF ailesine ait ölüm reseptörlerinin uyarılması ile başlatılır. Her iki yolak da kaspaz-3 gibi efektör kaspazların aktivasyonu noktasında sonlanır ve hücre boyutunun küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcik oluşumu gibi değişiklikler meydana gelir [28, 69, 70].

Piroptoz inflamasyonun eşlik ettiği, hücre membran devamlılığının bozulması ile hücre içeriğindeki yapılar ile birlikte inflamasyonu uyaran IL-1β ve IL-18 gibi sitokinlerin hücre dışına salınmasına yol açan hücre ölüm yolaklarından biridir. Mikroorganizmalara ait yapısal elamanlar ve hücresel hasar sonucu ortaya çıkan moleküler yapılar ile uyarılan piroptoz süreci, nötrofil ve makrofajlardaki reseptörler ile algılanıp, inflamazom yapılarının dolayısıyla kaspazların aktivasyonuna yol açarak bir yandan IL-1β ve IL-18'in biyolojik aktif formlarına dönüşmesini bir yandan da Gasdermin D vasıtasıyla hücre plazma zarında delikler açılıp hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır [71].

Nekroptoz hücrelerde nekroz benzeri yapısal değişikliklere yol açan ancak rastgele bir hücre ölümünden çok belirli kontrol mekanizmaları tarafından işletilen, kaspazların aktif olarak görev almadığı, inflamasyonun eşlik ettiği bir hücre ölüm sürecini temsil etmektedir. Apoptozda olduğu gibi inflamasyonunun sınırlandırılıp, sonlandırılmasını sağlamak yerine bu süreç hücre bütünlüğününün ortadan kalkması ile bol miktarda hasar ilişkili moleküler yapıların ortama saçılmasına yol açarak inflamasyonun artarak devam etmesine yol açabilmektedir [72].

Ferroptoz bahsettiğimiz diğer üç hücre ölüm mekanizmasından farklı özellikler gösteren, demire bağımlı olarak gelişen bir hücre ölüm yoludur. Bu süreçte hücre zarında lipid kaynaklı oksidatif hasarın ortaya çıkması ve buna eşlik eden reaktif oksijen ürünleri üretiminde gözlenen artış önemli bir yere sahiptir. Lipid peroksidasyonunun devam etmesi, hücre içi iyon dengesinin bozulmasına, hücre boyutunun artması ve hücresel bütünlüğünün kaybına yol açarak hücre ölümünü tetikler. Bu sürecin önemli düzenleyicilerinden biri olan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) enzimi, zar lipidlerinde oluşan peroksitleri nötralize ederek oksidatif strese bağlı hasarı kontrol altında tutabilmektedir [73, 74].

Nötrofil hücre ölüm mekanizmalarından biri olan NETosis hakkında bir sonraki bölümde ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

2.2.1. NETosis

Nötrofiller tarafından gerçekleştirilen ve hücre dışı ağ yapılarının oluşumu ile karakterize olan NETosis, özelleşmiş bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanmaktadır [5]. Bu süreçte aktive olmuş nötrofiller, hücre dışına salınan ve NET olarak adlandırılan fibröz DNA-protein ağları oluşturur [75].

Nötrofillerin hücre dışına nükleik asit içeren yapılar salabildiğine ilişkin ilk ipuçları 1990'lı yıllarda yapılan bazı deneysel çalışmalar sırasında ortaya çıkmıştır. Bu dönemde araştırmacılar, aktive olmuş nötrofillerin hücre dışı ortama DNA içeren materyal bırakabildiğini gözlemlemişlerdir; ancak bu hadisenin biyolojik faydası o yıllarda tam olarak anlaşılmamıştır. Söz konusu gözlemler başlangıçta çoğunlukla hücresel hasar veya nekrotik süreçlerin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir [15, 69]. Bu alanda dikkatleri üzerine çıkan çalışma 2004 yılında Brinkmann ve arkadaşları tarafından yayınlanmış ve aktive nötrofillerin kromatin iplikleri ile granüler proteinlerden oluşan NET denilen ipliksi yapılar oluşturarak mikoorganizmaları tutsak edebildiği gösterilmiştir. Bu mekanizmanın mikropların yok edilmesinde daha önce bilinen nötrofil fonksiyonlarının dışında yeni tanımlanan özgün bir hücresel fonksiyon olduğu kanaatine varılmıştır [69, 76].

NET'lerin artmış üretimi SLE, romatoid artrit (RA), ANCA ilişkili vaskülit (AAV), Behçet hastalığı, DADA2, antifosfolipid sendromu, psöriazis, gut gibi romatolojik hastalıklarda preeklampsi, infeksiyonlar, ateroskleroz ve tümör immünopatogenezi gibi çok sayıda farklı klinik antitede gösterilmiştir [7, 11, 15, 75, 77-80].

NET'ler, aktive nötrofiller tarafından hücre dışına salınan gevşemiş kromatin liflerinden oluşan ağ benzeri yapılardır. Bu kromatin iskeleti yalnızca DNA ve histonlardan ibaret olmayıp nötrofil granüllerinde bulunan çok sayıda antimikrobiyal molekül ile birlikte bir yapılanma gösterir. NET yapısı üzerinde başlıca proteazlar, oksidatif enzimler ve çeşitli antimikrobiyal peptidler yer alır. Nötrofil elastaz, miyeloperoksidaz ve proteinaz-3 gibi granül enzimlerinin yanı sıra bazı alarmin proteinler ve katelisidin ailesine ait peptidler de bu yapıya eşlik edebilmektedir [4, 81, 82].

NET'lerin moleküler bileşimi sabit bir yapı sergilemeyip, NET oluşumunu tetikleyen uyaranın niteliğine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. NET içeriklerindeki bu yapısal farklılıklar, NET'lerin bir kısmının immün yanıtlar sırasında bireyin patojenlere karşı korunmasında, diğer bazı NET oluşumlarının ise kanser biyolojisi ve otoimmünite temelli klinik durumlar ile ilintili süreçlerde yer almasına yol açabilmektedir [82].

NETosis süreci, çok sayıda farklı uyarıcı tarafından tetiklenebilen bir mekanizmadır. Bu süreç mikrobiyal etkenlerin dışında ürik asit gibi kristal yapılı uyarıcılar, antikorlar ve immün kompleksler gibi immünojenik uyaranlar tarafından da başlatılabilmektedir. Ayrıca proinflamatuvar sitokinler, otoantikorlar ve aktive trombositler gibi inflamatuvar mikroçevrede bulunan faktörlerin de NET oluşumunu indükleyebildiği gösterilmiştir [6, 81]. Diğer taraftan deney tasarımında *in vitro* koşullarda NET oluşumu çeşitli kimyasal ve biyolojik uyarıcılar aracılığıyla indüklenebilmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan güçlü uyarıcılardan biri olan PMA protein kinaz C yolaklarını aktive ederek NADPH oksidaz bağımlı reaktif oksijen ürünleri oluşumunu uyarır. Bunun dşında kalsiyum, bakteri yapısal elemanlarından lipopolisakkaritler NET oluşumunu tetikleyebilmektedir [6, 82, 83].

Nötrofillerin hücresel yaşlanması, olgunluk derecesi, bulunduğu doku ortamı maruziyetleri ve hastaya ait metabolik veya sistemik hastalıklar NET oluşum eğilimini belirleyebilmektedir. Diyabetli bireylerden izole edilen nötrofillerde peptidil arjinin deiminaz-4 (PAD4) ekspresyonunun artmış olması, bu hücrelerin NET oluşturma potansiyelinin yükselmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında tümör inflamatuvar ortamında bulunan ve yaşlanmış nötrofil karakterini yansıtan, CXCR4 ekspresyonu artmış ve CD62L düzeyi azalmış hipersegmente çekirdekli nötrofillerin, özellikle mitokondriyal DNA salınımı ile gerçekleşen NET oluşumuna daha eğilimli olduğu gösterilmiştir [84].

2.2.1.1. NETosis mekanizmaları

Son yıllarda elde edilen bulgular, NET oluşumunun tek bir hücresel yolakla sınırlı olmadığını, farklı uyarıcılar ve sinyal mekanizmaları aracılığıyla gelişebilen çok aşamalı bir süreç olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle güncel literatürde NET oluşumunu sağlayan iki temel mekanizma: hücre ölümünün eşlik ettiği suisidal NETosis ve nötrofil canlılığının korunabildiği vital NETosis olarak sunulmaktadır [82].

I. Suisidal (Litik) NETosis: Nötrofil aktivasyonu sonrası hücre ölümü ile sonuçlanan NET oluşum mekanizmalarından olup, ilk olarak güçlü bir *in vitro* uyarıcı olan PMA ile indüklenmiştir. Bu süreç genellikle birkaç saat içinde gelişen ve NADPH oksidaz enzim aktivitesine bağımlı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Hücresel aktivasyon sonrasında reseptör vasıtasıyla ulaştırılan sinyaller hücre içi kalsiyum seviyelerini arttırır ve bunu takiben protein kinaz C ile farklı hücresel kompartımanlarda bulunan NADPH oksidaz enzim kompleksi alt birimlerinin membranda birleşmesiyle aktivasyon gerçekleşir. Bu aşamada oluşan ROS, nötrofil elastaz ve miyeloperoksidaz gibi proteazların aktive olmasına ve bunların çekirdeğe doğru hareketine katkıda bulunur. Nötrofil elastaz, histonları enzimatik yıkıma uğratarak, kromatin yapısını gevşetirken peptidil arjinin deiminaz-4 yardımıyla histonların sitrülinlenmesi, kromatin bütünlüğünün bozulmasında önemli basamakları oluşturmaktadır. Çekirdek etrafındaki bütünlüğün bozulması ile kromatin sitoplazma ile karışır ve hücre membranında meydana gelen deliklerden DNA, histonlar ve granül proteinlerinden oluşan NET yapıları hücre dışına salınır. Bu mekanizma sonucunda nötrofil hücresi lizise uğrar. Söz konusu NET oluşum mekanizmasının, PMA gibi farmakolojik uyarıcıların haricinde bazı patojenler ve kristal yapıdaki inflamatuvar tetikleyiciler tarafından da ortaya çıkabildiği bildirilmektedir [4, 43, 85, 86].

NETosis sürecinde kromatin yapısının yeniden düzenlenmesinde görev alan önemli elemanlardan biri PAD4 enzimidir. PAD4, proteinlerde yerleşik arjinin kalıntılarının sitrüline dönüştürülmesini sağlayan sitrülinasyon reaksiyonunu sağlayan enzim ailesinin bir elemanıdır. Bu süreçte arjinin rezidülerinin sitrüline dönüşmesi, protein yapısında meydana gelen bir kimyasal değişiklik olup ilgili molekülün elektriksel yük özelliklerini değiştirerek, histon–DNA etkileşimini zayıflatabilmektedir. PAD enzim ailesi içerisinde PAD4, özellikle granülositer seri hücrelerinde belirgin şekilde bulunan izoformlardan biridir. Bu enzimin diğer PAD çeşitlerinden farklı olarak çekirdeğe yönlendirilmesini sağlayan yapısal özellikleri bulunmaktadır. Dinlenim durumundaki nötrofillerde PAD4'ün büyük ölçüde çekirdek bölgesinde yer aldığı ve burada histon proteinleri üzerinde sitrülinasyon reaksiyonlarını gerçekleştirdiği gösterilmiştir. H2A, H3 ve H4 histonlarının belirli bölgelerinde bulunan arjinin aminoasitlerinin sitrüline dönüştürülmesi, DNA ile histon arasındaki etkileşim kuvvetini aşağı çekerek; kromatin yapısının daha gevşek bir yapısal değişim göstermesini

sağlamaktadır. Çalışmalarda PAD4 enzim aktivitesine bağlı gelişen yoğun histon sitrülinasyon sürecinin infeksiyonlar, romatolojik hastalıklar, vasküler tromboz ve bazı kanser tiplerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir [3, 87].

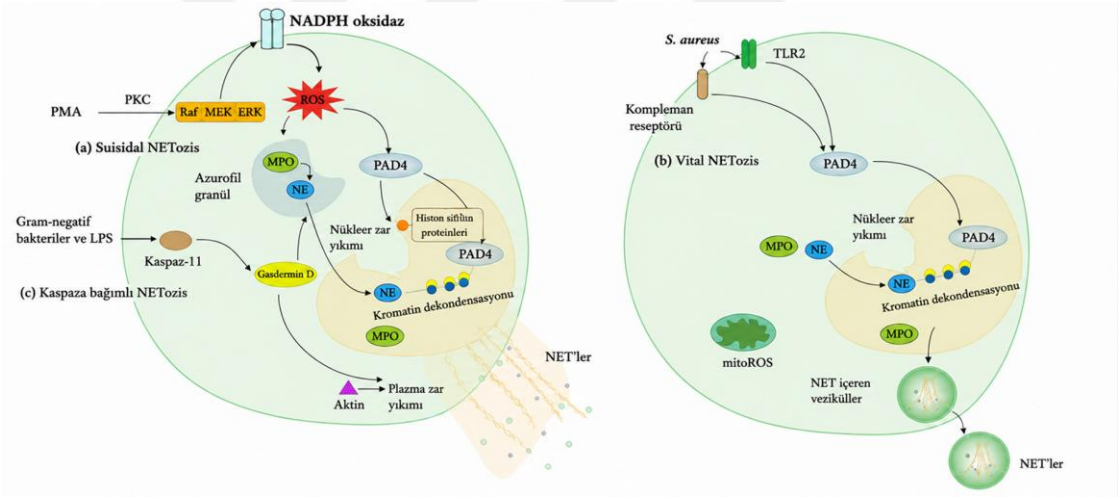
NET oluşum sürecinin önemli oyuncularından biri de azurofilik nötrofil granül proteinleri olan nötrofil elastaz (NE), miyeloperoksidaz (MPO), proteinaz 3 (PR3) gibi proteolitik enzim aktivitesine sahip moleküllerdir. Çeşitli uyaranlar ile nötrofiller aktive olunca NAPPH oksidaz katalizörlüğünde üretilen ROS bileşenleri ortamı oksitler. Bu ortam, granül içerisinde yer alan NE gibi moleküllerin hareketine yol açarak çekirdeğe yönlenen enzimin burada histon proteinlerini parçalamasına yol açar. ROS üretimi sırasında açığa çıkan hidrojen peroksidin MPO tarafından farklı oksidanlara dönüştürülmesi NET oluşum sürecini destekleyen hücresel sinyal yolaklarını etkileyebilir. Tüm bunlara rağmen proteazların süreçteki performansları tüm NET uyarıcıları için aynı şekilde sonuçlanmayabilir [3, 88].

Nötrofil elastaz veya PAD4 gibi moleküllerin inhibisyonunun bazı deneysel modellerde NET oluşumunu belirgin biçimde azalttığı bildirilmiş olsa da, farklı uyaranlarla indüklenen NETosis süreçlerinde bu enzimlerin baskılanmasının NET salınımını tamamen ortadan kaldırmadığı da gösterilmiştir. Bu durum sürecin tek bir yolak ile ilerlemediğini, farklı uyaranlarla aktive edilen NETosis yanıtlarında alternatif yolların devreye girebildiğini desteklemektedir [3, 87, 89, 90].

II. Vital (Non-litik) NETosis: Nötrofillerin canlılığını ve bazı işlevsel özelliklerini (patojen tanıma, fagositoz, migrasyon vb) kaybetmeden, plazma zarı devamlılığının korunduğu bir süreçtir. NADPH oksidaz enziminden bağımsız bir şekilde lipopolisakkaritler gibi bakteri yapı taşları, kalsiyum, trombositlerin TLR4 üzerinden aktive olması ve kompleman sistemi ile ilişkili TLR2 ligandlarının etkileşimi gibi uyarılar ile dakikalar içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleşen NET oluşum basamaklarını içermektedir. Artan hücre içi kalsiyum ile aktive olan PAD4 enziminin histonları sitrüline etmesi ve proteaz enzim aktiviteleri ile histonların gevşek hale gelmesi, mitokondri kaynaklı reaktif oksijen ürünlerinin üretiminde artış ve nihayetinde membran bütünlüğü sağlam kalırken nükleer içeriğin veziküller vasıtasıyla hücre dışına saçılması ile sonuçlanmaktadır [4, 85, 91, 92].

Son yıllarda bu iki ana NET oluşum mekanizmalarının dışında; ROS üretimi ve NET'lerin oluşumunda mitokondrilerin yerine dikkat çekilmektedir [93]. İlk olarak

Yousef ve arkadaşları tarafından tanımlanan bu süreçte nötrofiller parçalanmadığı için, aslında bunun bir non-litik NETosis süreci olduğu düşünülmektedir [82]. ROS üretimi NADPH oksidaz sistemi dışında mitokondri içerisinde bulunan solunum zinciri elemanları sayesinde de yapılabilmektedir. Oksidatif süreçlere maruz kalan mitokondriyal DNA, proinflamatuvar bir karakter göstererek ve hücre içindeki DNA tanıma mekanizmalarını aktive ederek tip I interferon yanıtını başlatabilmektedir [93]. SLE hastalarının uyarımsız şartlarda bile NETosis eğilimi gösteren düşük dansiteli nötrofillerinde mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerinin üretimi önem arz etmektedir. Hücre içi mitokondri kaynaklı ROS üretiminin engellenmesi lupus hastalığı özelliği gösteren farelerde hem tip 1 interferon aracılı hücresel immün cevapları hem de hastalık semptomlarını hafifletmiştir [94]. Li ve arkadaşlarının çalışmasından uyarlanan nötrofillerde NET oluşumunun temel basamakları Şekil 2'de gösterilmiştir [95].



Şekil 2. NET oluşum mekanizmaları (Li ve ark. çalışmasından uyarlanmıştır)[95].

Kısaltma açıklamaları: NET: nötrofil ekstraselüler tuzakları, PMA: forbol miristat asetat; PKC: protein kinaz C.

2.2.1.2. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzak (NET) Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

NET oluşumlarının ölçülmesi ve değerlendirilmesinde farklı uygulamalar kullanılabilmektedir. Burada hücre dışına saçılan NET yapılarının ölçümü dışında NET oluşturma potansiyeli yüksek hücre gruplarının belirlenmesi de önem arz etmektedir. NET'lerin hem niceliksel hem de niteliksel olarak değerlendirilmesinde kullanılan her bir yöntemin bir başka yönteme karşı üstünlüğü ya da dezavantajı bulunabilmektedir [70, 96-99]. Bu yöntemler temel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir:

-Mikroskobik incelemeye dayalı yöntemler: En yaygın kullanılan yaklaşımlardan biri immünfloresan ya da elektron mikroskop temelli hücre düzeyindeki incelemelerdir. Ayrıca bu grupta konfokal veya çoklu lazer mikroskop sistemleri kullanılarak canlı dokular içerisinde NET yapılarının incelenmesi sağlanabilmektedir. Bu yöntem sayesinde hücresel düzeydeki inflamatuvar ve moleküler olaylar eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir [96]. İmmünfloresan incelemede hücre dışına salınan DNA bağlantılı nötrofil kökenli proteinlerin, özellikle miyeloperoksidaz ve nötrofil elastazın, aynı bölgede görüntülenmesi NET oluşumunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem NET yapılarını görsel olarak inceleme olanağı sunabilmesine rağmen elde edilen verilerin sayısal olarak değerlendirilmesi büyük ölçüde araştırmacının analiz yaklaşımına bağlı olduğundan sonuçlarda belirli bir yorum farklılığı ortaya çıkabilmektedir. NET oluşumunun tüm basamaklarını bütünüyle yansıtmayabilir. Uygulama kapasitesinin sınırlı olması ve floresan boyama sürecinde yaşanan tutarsızlıklar deney sonuçlarının tekrarlarının tutarlılığını etkileyebilmektedir [70, 96].

-Mikroplak yöntemi ile floresan inceleme: Tasarlanmş deney modellerinde PMA, bakteri yapıları gibi çeşitli uyaranlarla ile aktive olan nötrofiller ile NET oluşum süreci başlatılır ve süreç ilerledikçe nötrofil plazma zarı bütünüğü kaybolduğundan, normalde membranı geçemeyen DNA boyaları (SYTOX Green vb) hücre dışı DNA ile bağlanarak floresan ölçümlere imkan sağlar. Yöntemin örnek çalışma gücü mikroskobik değerlendirmelerden fazladır. Ancak bu yöntemin dezavantajı hücre zarında hasara yol açarak nükleer hücre içeriğinin dışarı salınmasına yol açan her türlü etken yalancı pozitif sonuçlara yol açabilmesidir. Hücre dışı ortamda saptanan nükleer içerik, nötrofil dışında başka hücreler tarafından da oluşturulabildiği için özgüllüğü yüksek olmayan bir değerlendirme yöntemi olarak düşünülebilir [70, 97, 99].

-Çözünür NET bileşenlerinin ölçülmesi: NET ölçümünde kullanılan bir diğer uygulama nötrofil kültür üst sıvılarında ya da plazmada bulunan NET oluşumlarının enzim bağlı immünosorbent analiz (ELISA) yöntemi ile ölçülmesi olup, kolay uygulanabildiği için klinik temelli araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. MPO-DNA kompleksi, sitrülinlenmiş histon H3 gibi bileşenlerin ölçülmesi tek başına serbest hücresiz DNA (cf-dsDNA) ölçümlerine göre daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmesini sağlayabilir. Çok sayıda örneğin kısa sürede değerlendirilebilmesini sağlamanın yanında, kitlerin temin edilebilirliğinin ve maliyet açısından erişilebilir oluşunun da

önemli avantajlar sağladığı düşünülmektedir. Ancak farklı firmalardan alımı gerçekleştirilen kitler ile yapılan ölçümlerde sonuçların farklılık gösterebilmesi ve deney ortamlarında elde edilen veriler ile canlı organizma içerisindeki gerçek NET sonuçlarının her zaman örtüşmemesi yöntemin önemli dezavantajlarıdır [70, 96, 97]. Miyeloperoksidazın katyonik bir protein olması, dolaşımdaki negatif yüklü DNA molekülleri ile elektrostatik etkileşim kurabilmesine neden olduğundan dolaşımda tespit edilen MPO-DNA birliktelikleri her zaman NET kökenli yapıları yansıtmayabilir [100]. Ayrıca bazı otoimmün hastalıklarda serum DNaz aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle tespit edilen serbest NET düzeyleri hücresel düzeydeki NET oluşumunu doğru olarak yansıtmayabilir [7, 97].

-Akan hücre ölçer yöntemi ile NET'lerin değerlendirilmesi: Hem hücre dışı hem canlı hücre düzeyinde NET'lerin değerlendirilmesinde tercih edilen analiz tekniklerinden biridir. Bu analiz NET bileşenlerinin ve nötrofil kökenli belirteçlerin aynı anda incelenmesine olanak sunmaktadır. Nötrofil membranından geçmeyen DNA afinitesi olan boyalar, hücre dışındaki DNA'nın ölçümünü, nötrofil yüzey moleküllerine bağlanabilen floresan işaretli antikorlar NETosis sürecindeki nötrofillerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Yöntem incelenen örneğin az ve sınırlı olduğu durumlarda bile çok sayıda hücrenin, hızlı bir şekilde analiz edilmesini sağlar. Nötrofillerin fonksiyonel ve sayısal açıdan incelenmesine uygun bir prosedürdür. Bu teknik, hücre bütünlüğü korunmuş nötrofilleri analiz edebildiğinden, NET oluşum sürecinin başlangıç basamaklarında yer alan ve henüz NET salınımını gerçekleştirmemiş hücrelerin belirlenmesine olanak sağlayabilmektedir [96, 97, 101]. Akan hücre ölçer yöntemlerinin NET'lerin ölçülmesinde kullanıldığı çalışmalarda örnek hazırlama basamakları ve analiz sırasında kullanılan hücre seçimi parametreleri yönünden farklılıklar bulunduğu gerçeğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir [102].

2.3. Romatolojik Hastalıklarda NETosis

Geçmişte sistemik otoimmün hastalıkların patogenezi büyük ölçüde adaptif bağışıklık sistemindeki düzensizlikler ile açıklanmaktayken son yıllarda elde edilen veriler, doğuştan gelen bağışıklık sistemine ait hücrelerin ve özellikle tip I interferon yolaklarının da bu hastalıkların gelişiminde önemli katkılar sağlayabileceğini ortaya koymuştur. Bu yönüyle nötrofillerin sistemik otoimmünite patogenezinde aktif rol oynayan hücreler arasında yer aldığı anlaşılmıştır. Hem insan çalışmaları hem de

deneysel hayvan modelleri, bu hücrelerin inflamasyon bölgelerinde biriktiğini ve lokal inflamatuvar yanıtın devamında etkili olabileceğini göstermektedir. Nitekim vaskülitlerde damar duvarı ve endotel dokusunda, romatoid artritte ise sinovyal dokuda belirgin nötrofil infiltrasyonu saptanmıştır [6, 46, 75].

Otoimmün ve inflamasyon aracılı çok sayıda hastalığın immünopatogenezinde NETosis sürecinin rolü olduğu bilinmektedir. Romatoid artrit, juvenil idyopatik artrit, sitemik lupus eritematozus, psöriazis, gut, inflamatuvar miyopatiler, piyojenik artrit-piyoderma gangrenozum ve akne birlikteliği ile karakterize PAPA sendromu, anti nötrofil sitoplazmik antikor (ANCA) ilişkili vaskülitler, Behçet hastalığı, antifosfolipid sendromu gibi çok sayıda romatolojik hastalıkta NET oluşumlarının arttığı bildirilmektedir [2, 7, 46, 103-106].

Aşırı ve kontrol altında olmayan NET yapılarının oluşumu veya NET'lerin vücuttaki degradasyon sürecindeki bozulmalar dokuda istenmeyen hasar bulgularının gelişimine ve inflamasyonun artarak devam etmesine yol açabilmektedir. Toll benzeri reseptör sinyalleri üzerinden NET içerikleri doku hasarını arttırabilir. NET'ler içerikleri nedeniyle otoantikorların hedef epitoplarını taşıyabilirler. Diğer taraftan otoantikorlar da nötrofilleri uyararak NET'lerin daha fazla oluşmasına ya da NET'lerin yıkım sürecinin sekteye uğramasına sebep olarak, doğuştan ve edinsel immün sistemler arasındaki bu kısır döngüyü destekleyebilmektedir. NET bileşenleri direkt olarak ya da NETosis sırasında oluşan hücre dışı DNA, kompleman kaskadı üyelerini aktive edebilir ve interferon üretimini teşvik edebilir [7, 15, 46, 103, 104, 107-109].

cf-dsDNA terminolojisi, hücre hasarı veya hücre ölümü sonrası dolaşıma salınan DNA birimlerini ifade etmek için kullanılmaktadır. Bu süreç NETosis, apoptoz ve nekroz gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşebilir. cf-dsDNA içerik olarak büyük oranda çift zincirli nükleer DNA ve mitokondriyal DNA parçalarından oluşmakta olup, yalnızca hücre ölümü sonucu değil, canlı hücrelerden de hücre dışı ortama salınabilmektedir. Bu nedenle cf-dsDNA ölçümü çok sayıda aktif hücresel olayın takibinde önemlidir [110]. NETosis sırasında açığa çıkan cf-dsDNA'nın, SLE, aksiyel spondiloartrit, IgA vasküliti ve ANCA ilişkili vaskülit gibi farklı otoimmün romatolojik hastalıklarda hastalık aktivitesi ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir [104, 111-115]. Bunun yanı sıra cf-dsDNA çeşitli malignitelerde tanı, hastalık izlemi ve prognoz tayininde, transplantasyon

immünolojisinde rejeksiyon reaksiyonlarının tespit edilmesinde, preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir [116-119]. cf-dsDNA, yalnızca nötrofil ekstrasellüler tuzakların oluşumu sonucu dolaşıma salınan bir molekül olmayıp apoptoz, nekroz ve farklı hücresel süreçler sırasında da açığa çıkabilmektedir. Nötrofiller dışında immün sisteme ait bazı hücrelerin hücre dışı serbest DNA yapıları oluşturabilmesi nedeniyle, total cf-dsDNA düzeylerinin tayini NETosis için özgül bir belirteç olarak kabul edilmemektedir. Bu nedenle NETosis değerlendirmesinde cf-dsDNA'nın, nötrofil kaynaklı proteinler ve DNA-histon kompleksleri ile birlikte değerlendirilmesinin daha değerli olduğu bildirilmektedir [120].

Bazı çalışma tasarımlarında NET oluşumlarının belirli sitokin ve kemokinleri enzimatik aktivite ile parçalayarak, inflamasyonun sınırlandırılmasına yol açabildiği gösterilmiştir [121]. Yani NET yapılarının immün sistemi hücrenin içinde bulunduğu şartlara göre her iki yönde de etkileyebilme potansiyeli olduğundan, otoimmün hastalıkların tedavi süreçlerinde bu oluşumları hedef alan ajanların kullanımı günlük pratiğe henüz adapte edilememiştir [79].

2.4. Behçet Hastalığının Klinik ve Genetik Özellikleri

Behçet hastalığı ilk olarak Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral aftlar, genital ülserler ve üveit bulgularından oluşan bir klinik antite olarak tanımlanmıştır. İlerleyen yıllar içerisinde hastalık tutulum alanlarının bu kadar sınırlı olmadığı, vücutta birbirinden farklı çok sayıda dokuda inflamatuvar olaylar zinciri ile seyreden multisistemik bir hastalık olduğu ortaya konulmuştur. Deri ve mukoza lezyonlarına ek olarak göz, eklem, damar, akciğer, sinir sistemi ve gastrointestinal sistem gibi farklı organ ve sistem tutulumları hastalığın klinik spektrumunu oluşturmaktadır [122-124].

Hastaların önemli bir bölümünde ilk yakınma oral aftlar olurken, genital ülserler daha uzun sürebilmekte ve iyileşme sonrasında iz bırakabilmektedir. Hastalıkta akneiform papülopüstüler döküntüler, psödofolikülit görünümü ve eritema nodozumu andıran nodüler deri lezyonları görülebilmektedir. Kas-iskelet sistemi tutulumu çoğunlukla destrüktif olmayan, aralıklı artrit veya artralji atakları şeklinde seyretmekte olup ve büyük eklemleri tutma eğilimindedir. Göz tutulumu Behçet hastalığının önemli organ tutulumlarından biri olup intraoküler inflamasyon ve retinal damar etkilenmesi ile karakterizedir. Özellikle arka segment tutulumu bulunan hastalarda kalıcı görme kaybı

ile sonuçlanabilmektedir. Nörolojik olarak santral sinir sisteminde parankimal inflamasyon ya da vasküler tutulum görülebilmekte klinik olarak baş ağrısı, fokal nörolojik defisitler, nöbetler ve beyin sapı bulguları ile kendini gösterebilmektedir. Gastrointestinal sistem tutulumu çoğunlukla ülseratif bağırsak lezyonları şeklinde olup karın ağrısı, diyare ve gastrointestinal kanama gibi semptomlara neden olabilmektedir. Behçet hastalığın klinik bulguların çeşitliliği, hasta özelinde baskın olan klinik tutulum bulgularının özelliklerine göre hastalığın fenotipi hastalar arasında değişkenlik gösterebilmektedir [23, 125].

Epidemiyolojik veriler Behçet hastalığı prevalansının coğrafi olarak belirgin farklılıklar gösterdiğini, en yüksek oranların İpek Yolu olarak adlandırılan güzergâhta görüldüğünü ortaya koymaktadır. Türkiye'de prevalansın 100.000'de 80–370 arasında değiştiği, Orta Doğu ve Asya ülkelerinde de hastalık prevalansının yüksek olduğu, buna karşılık Avrupa ve Amerika'da bu oranın belirgin şekilde daha düşük olduğu (0,1–7,5/100.000) saptanmıştır. Ayrıca bölgesel farklılıkların hastalığın cinsiyet dağılımı açısından da önem arz ettiği, Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinde erkeklerde daha sık görülürken; Amerika Birleşik Devletleri ile Uzak Doğu ülkelerinde (özellikle Japonya ve Güney Kore) kadınlarda daha yüksek sıklık bildirilmektedir [126].

Behçet hastalığı, çoklu organ tutulumuna yol açabilen, klinik olarak heterojen bir sistemik vaskülit spektrumu içinde değerlendirilen sınıflandırma açısından tek patogenez başlığı altında kolayca yerleştirilemeyen immün aracılı bir hastalıktır. Hastalığın etiyolojisi belirsizliğini korurken, farklı otoriteler tarafından bu hastalığın otoinflamatuvar–otoimmün spektrumun kesişiminde bulunduğu ve bu durumun hem doğuştan hem de edinsel bağışıklık yanıtlarda bozulmaya neden olabileceği saptanmıştır [127].

Behçet hastalığı genellikle ataklar halinde seyretmekte olup, bu alevlenmeler farklı sistemlerde ortaya çıkabilmektedir. Bazı hastalarda zaman içinde geri dönüşü olmayan organ disfonksiyonu, kalıcı sekeller ve yaşamı tehdit eden sonuçlara neden olabilmektedir. Demografik olarak daha çok genç-orta yaş grubunda, cinsiyetler arasında belirgin ayrım olmaksızın ortaya çıkan hastalık, genç erkek hastalarda daha ciddi ve ağır tutulumlar ile klinik olarak daha endişe verici seyredebilmektedir [122].

Vasküler Behçet; Behçet hastalığı klinik fenotipleri arasında en önemli ve en ciddi tutulumlardan biri olup küçük çaplı damarlardan geniş çaplı arter ve venlere kadar her genişlikte ve her çeşitte damarı etkileyebilen bir vaskülit tablosu olarak görülebilmektedir. Vasküler tutulum çoğunlukla venöz sistemde tromboz şeklinde ortaya çıkar ve hastaların yaklaşık %15–40'ında izlenir. Hastalıkta tanı esnasında ya da tanıdan sonraki erken dönemlerde derin ven trombozu şeklinde damar tutulumu görülebilir ve başta alt ekstremite derin ve yüzeyel venleri olmak üzere hepatik venler, vena cava inferior gibi viseral organlara ait ven sistemleri, santral sinir sisteminde dural venler, sağ kalp boşlukları gibi damar yatağının farklı bölgeleri etkilenebilmektedir. Hepatik ven trombozu ile ortaya çıkan Budd-Chiari sendromunda tahmini bir yıllık yaşam beklentisi düşük olup, ciddi bir tablodur [128-130]. Tromboz dışında damar lümeninde daralma, oklüzif veya anevrizmatik damar duvarı değişiklikleri gibi vasküler tutulumla ilişkili bulgular da görülebilmektedir. Tromboz oluşma sürecinde hemostatik sisteminin koagülasyon kaskadını ilgilendiren mekanizmalardan ziyade, damar duvarında gelişen inflamatuvar olayların rolü üzerinde durulmaktadır. Oluşan trombüslerin damarın endoteline sıkıca yapışık olup tromboembolik bir sürece ait kanıtların olmaması bu kanıyı desteklemektedir [128].

Arteriyel tutulum görülme oranı daha düşük (%5-10) olup, venöz tutulumlara kıyasla hastalığın daha geç dönemlerinde ortaya çıktığı bildirilmektedir. Abdominal aorta, pulmoner arterler, viseral organlara ait arterlerde damar duvarında anevrizmatik genişleme ve trombüs gelişimi şeklinde görülebilmektedir. Anevrizmatik damar duvarı değişiklikleri rüptüre olma riski nedeniyle mortalite açısından belirgin risk oluşturmaktadır. Vasküler Behçet hastalığı tanısının olabildiğince erken dönemde konularak, hastaların uygun ve yeterli düzeyde immünsüpresif ajanlar ile tedavi edilmesi, hastalığın takip sürecinde ortaya çıkma riski artan farklı damar bölgelerindeki yeni lezyonların ya da aynı damar trasesindeki nükslerin ortaya çıkmasını engelleme açısından son derece önemlidir [128-130].

Behçet hastalığının patogenezi tüm yönleriyle çözülememiş olsa da genetik temeli olan kişilerde çevresel bazı tetikleyiciler ile immün sistemin uyarılması ile hastalığın ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Bazı ailelerde birden fazla bireyde görülmesi ve aile içi kümelenmenin bildirilmesi genetik yatkınlığı destekleyen önemli bulgular arasında olup, erken hastalık başlangıcı gösterenlerde daha fazladır [131].

Genetik çerçevede HLA-B51'in, Behçet için en güçlü yatkınlık aleli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [132]. Zaman içerisinde yapılan çalışmalarda hastalığın başka farklı MHC-I allelleri (HLA-B15, HLA-B27, HLA-A26 vb) ile olan ilişkisinin ortaya konulması ile MHC-I-opatiler olarak değerlendirilebileceği fikri desteklenmiştir. Ayrıca endoplazmik retikulum içerisinde yer alan peptidlerin kırpılmasında önemli rol oynayan enzimi kodlayan, spondiloartrit immünopatogenezinden çok iyi bildiğimiz ERAP1 (endoplazmik retikulum aminopeptidaz-1) gen varyantlarının oluşturduğu farklı peptid repertuvarlarının MHC sınıf I molekülleri aracılığıyla sunulmasının bağışıklık yanıtını değiştirerek Behçet hastalığının patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir [131, 133, 134]. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS); IL-10, IL-23R/IL-12R, STAT4, IRF8, NOD2, MEFV, öldürücü hücre lektin benzeri reseptör gen kompleksi, Toll benzeri reseptör genleri, TNFAIP3, NLRP3 gibi çok sayıda gen lokusunun hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [132, 135, 136].

2.4.1. Behçet Hastalığında Sınıflandırma Kriterleri ve Hastalık Aktivitesi

Behçet hastalığında hastalığa özgü spesifik bir biyokimyasal gösterge henüz bulunmadığı için tanı esas olarak klinik bulguların değerlendirilmesi ve bu konuda deneyimli uzmanların görüşüne dayanmaktadır. Tanı koyma sürecindeki zorlukları kısmen aşabilmek ve çalışma tasarımlarında tanımlanan hasta gruplarını daha homojen hale getirmek amacıyla çeşitli sınıflandırma kriterleri geliştirilmiştir. Bu kriterler arasında en yaygın kullanılanları; 1990 yılında aralarında Türkiye'nin de yer aldığı yedi ülke tarafından tanımlanan Uluslararası Çalışma Grubu (ISG) kriterleri ile 2006 yılında tanımlanan ve 2014 yılında revizyonu gerçekleştirilen Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterleri (ICBD)'dir [23].

ISG kriterlerine göre Behçet hastalığı olarak sınıflandırma yapılabilmesi için ağız içi aftların varlığı mutlak kriter olup yanına genital aftöz yaralar, deri bulguları (eritema nodozum, psödofollikülit), göz bulguları (üveit, retinal vaskülit) ve paterji reaksiyonu pozitifliği bulgularından en az ikisinin eklenmesi gerektiği belirtilmiştir. ISG kriterlerinin duyarlılığının %80'ler civarında düşük, özgüllüğünün %96-97 civarında yüksek olduğu değerlendirilmiştir. ISG kriterlerine dayalı sınıflandırmalarda, hastaların bir kısmının yanlış negatif olarak sınıflandırıldığının anlaşılması ve bu kriterlerin sınırlılıkları nedeniyle, Uluslararası Behçet Hastalığı Derneği'nin bünyesinde kurulan bir ekip, ISG başta olmak üzere mevcut sınıflandırma kriterlerini daha fazla

sayıda ülkenin katılımıyla daha büyük bir hasta ve kontrol grubu üzerinde yeniden incelemişlerdir. 2014 yılında revize edilen Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterlerine (ICBD) göre; oral ve genital aftlar ile göz tutulumunun herbiri 2'şer puan, deri bulguları, vasküler ve nörolojik bulguların herbiri 1'er puan olup toplamda 4 ve üzeri puan alan hastalar sınıflandırmada Behçet hastalığı olarak kabul edilmiştir. ISG ve ICBD kriterlerinin mukayesesi, ICBD'nin duyarlılık açısından daha üstün olduğunu göstermektedir. ISG için duyarlılık yaklaşık %82–85 iken ICBD'de %94–96 seviyelerine ulaşmakta ve özgüllüğün ICBD'de daha düşük (%90–92) olduğu görülmektedir. Ayrıca paterji deri testinin puanlamalara eklenmesi duyarlılığı olumlu yönde etkilemektedir. Bu sonuçlara göre, ICBD'nin klinik pratikte ve çalışmalarda Behçet hastalığı snıflandırmasında daha değerli bir katkı sunduğunu düşünmek mümkündür [23, 25].

Behçet hastalığı ISG sınıflandırma kriterleri içerisinde de yer alan Paterji deri testi ilk defa Blobner tarafından tanımlanmıştır [137]. Testin esası steril bir iğnenin intradermal olarak uygulanmasından sonraki 24-48 saat içinde iğnenin giriş yerinde etrafı eritemli papüler yada steril püstüler deri lezyonu gelişmesine dayanmaktadır [25]. Paterji testinin uygulanmasında standart bir yöntem bulunmamakta ve kullanılan iğnenin kalınlığı (21–25 gauge arası), deriye giriş açısı ve tekli ya da çoklu iğne batırılması gibi teknik ayrıntılar uygulamalar arasında farklılık gösterebilmektedir [23]. Testin pozitiflik sıklığı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermekle birlikte, pozitif sonuçlanan testin özgüllüğü yüksektir. Paterji testi, lokal bir uyarana karşı doğal bağışıklık sisteminin gösterdiği nonspesifik bir aşırı duyarlılığı yansıtmaktadır. Paterji pozitifliğinin görüldüğü deri alanlarında yapılan histopatolojik değerlendirmelerde nötrofiller ve mononükleer hücrelerin perivasküler alanlarda biriktiği, iğne girişini takiben erken dönemde nötrofil kemotaktik kabiliyetleri ve fonksiyonel aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir [22, 138].

Behçet hastalığında inflamatuvar aktivite hastalık seyri boyunca aynı olmadığı için hastalık dönemsel alevlenmeler ve remisyonlarla ilerlemektedir. Klinik bulguların aynı hastada zaman içerisinde farklı organ tutulumlarıyla ortaya çıkabilmesi, hastalık aktivitesinin değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle yalnızca laboratuvar parametrelerine dayanan değerlendirmeler çoğu zaman yetersiz kalmakta ve klinik bulguların ayrıntlı bir şekilde her vizitte sorgulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu

amaçla geliştirilen Behçet Hastalığı Güncel Aktivite Formu (BDCAF), hastalığın son dört haftalık dönemdeki aktif klinik bulgularını değerlendirmeye yönelik düzenlenmiş bir aktivite indeksidir. Formda mukokutanöz bulgular, eklem yakınmaları, göz, gastrointestinal sistem, nörolojik ve vasküler tutulum gibi farklı klinik tutulumlara dair bulgular, sorular ile değerlendirilmektedir. BDCAF geliştirilirken farklı ülkelerde kullanılan aktivite ölçümlerinden yararlanılmıştır. Günümüzde BDCAF, Behçet hastalık aktivitesinin klinik olarak takip edilmesinde ve bilimsel çalışmalarda ortak ölçek üzerinden değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [139].

2.4.2. Behçet Hastalığının İmmünopatogenezi

Behçet hastalığında inflamatuvar sürecin ortaya çıkmasında hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık mekanizmalarının rol oynadığı kabul edilmektedir. Genetik olarak yatkın bireylerde çeşitli mikrobiyal antijenlerin, konağın self proteinleri ile yapısal benzerlik göstermesi nedeniyle gelişen çapraz immün yanıtlar sonucu hastalık sürecini başlatabileceği düşünülmektedir [140]. Behçet hastalığının etiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülen mikrobiyal ajanlar arasında *Streptokok* türleri üzerinde yoğunlaşılmıştır. Özellikle *S. sanguinis* kaynaklı bazı antijenlerin mukozal dokulardaki γδ T lenfositlerini aktive edebildiği ve bunun sonucunda çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu şekilde farklı streptokok suşları hastalığın klinik bulgularından olan tekrarlayıcı ağız içi aftöz yaraların ortaya çıkmasından da sorumlu olabilmektedir [22, 140].

İmmün sistemin farklı hücre alt gruplarında enfeksiyöz etkenlerin yapısal bazı elemanlarını (PAMP) tanıyan patern tanıyıcı reseptörlerde (PRR) yapısal ve fonksiyonel düzeyde meydana gelen değişikliklerin hastalık gelişimi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Behçet hastalarında çeşitli TLR'lerin nötrofil ve monositlerde yüksek düzeylerde eksprese edilmesi, mikrobiyal etkenlerden veya doku hasarından kaynaklanan sinyallerin daha güçlü algılanmasına yol açarak inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasını ve sürdürülmesini kolaylaştırabilir [141].

Hastalıkta özellikle nötrofiller ve monositlerde belirgin bir hiperaktivasyon, aktive olmuş nötrofillerin endotel hücreleri, trombositler ve diğer lökositlerle etkileşimi sonucunda oksidatif stresin artması, damar duvarı zedelenmesi ve inflamatuvar yanıtın artararak devam etmesi önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Bu süreçte TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 ve IL-33 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin artmış

düzeyleri, CXCR2, CXCR3 ve CCR5 kemokin reseptörlerinin artmış ekspresyonu inflamasyonun devamına katkıda bulunmaktadır. Kemokinler nötrofillerin ve Th1 hücrelerinin inflamasyon alanlarına çağrılmasını ve aktivasyonunu sağlamaktadır [21, 142, 143].

Behçet hastalarında hastalık aktivitesi ile uyumlu bir şekilde, hastalığın özellikle tutulum gösterdiği alanlarda (göz ön kamarasında aköz sıvı, eklem sıvısı, barsak epitel hücreleri vb) daha yüksek düzeylerde olmak üzere TNF-α üretimindeki artış, aktive makrofajlar, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından sağlanmaktadır [144]. TNF-α'nın hücre membranına bağlı formunun biyolojik etkilerini gösterebilmesi, membrana bağlı bir metalloproteinaz olan TNF-α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından kesilerek çözünür forma (sTNF- α) geçmesi gerekmektedir. Oluşan çözünür formun özellikle tip 1 TNF reseptörüne (TNFR1) bağlanması, hücre içinde NF-κB ve mitojenle uyarılmış protein kinaz (MAPK) sinyal yolaklarını aktive eder. Neticede proinflamatuvar medyatörlerin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonu artar. Ayrıca TNFR1 üzerinden iletilen hücre içi sinyal, kaspaz bağımlı hücre ölüm mekanizmalarını da tetikleyebilir. Hücresel ölüm sürecinde hasar ilişkili moleküler yapıların (DAMP'lar) açığa çıkması inflamatuvar yanıtın artmasına yol açabilmektedir [145, 146].

Çapraz immün reaksiyona yol açan mikrobik etkenlerin yardımcı T hücrelerine antijen sunumunu yoluyla T hücre aktivasyonunu uyarması, bu etkenlere ve otoantijenlere yönelik antikor yanıtlarının gelişmesi Behçet hastalığı patogenezinde edinsel immünitenin sürece dahil edilmesine katkıda bulunmaktadır [147]. Adaptif bağışıklık sistemi açısından bakıldığında Th1, Th17 ve Th22 hücresel yanıtlarının baskın hale geldiği gösterilmiştir. Th1 hücrelerinden salınan IL-12 ve IFN-γ gibi sitokinler hücresel immün yanıtı desteklerken, Th17 ve Th22 hücreleri inflamatuvar ortamın sürdürülmesine katkıda bulunan sitokinlerin üretimini artırmaktadır. Bunun yanı sıra γδ T hücrelerinin ve NK hücre alt gruplarının aktivitesinde NK1 yönünde artış görülürken immün regülasyonda önemli rol oynayan regülatör T hücrelerinin oranında ve işlevsel özelliklerinde azalma görüldüğü, bu hücrelerin ürettiği immün yanıtları baskılayıcı nitelikteki IL-10, IL-35 gibi sitokinlerin azaldığı bildirilmektedir [21, 142, 148].

2.4.3. Behçet Hastalığında Nötrofiller ve NETosis

Behçet hastalığı, nonspesifik uyaranlara karşı gelişen artmış inflamatuvar yanıt ile karakterizedir. Bu durum klinikte en iyi paterji testi uygulaması ile gösterilir ve doğal immün sistemin aşırı duyarlılığını yansıtır. Benzer şekilde inflammazom aktivatörlerine karşı gelişen abartılı yanıtlar da Behçet hastalığında inflamatuvar eşik düşüklüğünü desteklemektedir. Behçet hastalığında artmış inflamatuvar yanıtta IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin yükselmesi ve doğuştan immünite ile ilişkili gen varyantları (TLR4, NOD2 ve MEFV) ile ilişkilidir [24].

Behçet hastalığında nötrofillerin önemi hastalığın nötrofil baskın bir vaskülit tablosu olması ve tromboinflamatuvar süreçlerde bu hücrelerin izlerinin dokusal düzeydeki incelemelerde gösterilmesinden kaynaklanır [149]. Nötrofil hiperaktivitesi kavramı, yukarıda belirtilen klinik bulguların yanı sıra deneysel çalışmalarla da güçlendirilmiştir [107, 127]. Nötrofil aktivitesini yansıtan çeşitli yüzey aktivasyon belirteç artışlarının (CD11a, CD11b, CD66b, CD209 vb) akan hücre ölçer analizleriyle ortaya konulması, Behçet hastalarında nötrofillerin bu özelliklerini destekler niteliktedir [150].

Özellikle HLA-B51 ile ilişkili çalışmalarda, bu aleli taşıyan bireylerde ve transgenik modellerde nötrofillerin ROS üretiminde artış olduğu bildirilmiştir. Bu durum, Behçet hastalığında artmış oksidatif stresin damar duvarı hasarı ve tromboz gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, ROS artışının hastalık patogenezinde primer bir mekanizma mı yoksa inflamatuvar sürecin bir sonucu mu olduğu konusu halen tartışmalıdır [151].

İnsan çalışmalarında, Behçet hastalarında dolaşımdaki nötrofillerin *in vivo* ortamda önceden aktive olmuş fenotipe sahip oldukları bildirilmiştir. Bu durum, hücre yüzeyindeki aktivasyon belirteçlerinde ve fonksiyonel testlerde (aktivasyonla ilişkili antijen ekspresyonu ve ROS parametreleri gibi) saptanan değişikliklerle desteklenmektedir. Bu bulgular, nötrofillerin işlevsel etkinliklerinin daha düşük bir uyarı eşiğinde gerçekleşebileceğini düşündürmektedir [152].

Behçet hastalığında nötrofillerin NETosis'e yatkınlığının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda Behçet hastalarına ait nötrofillerin sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek düzeyde NET oluşturabildiği bildirilmiştir. Deneysel

veriler NET bileşenlerinin makrofaj aktivasyonunu uyarabildiğini ve buna bağlı olarak proinflamatuvar sitokin üretimini artırabildiğini göstermektedir. Ayrıca Behçet hastalarına ait plazma örneklerinin nötrofillerde oksidatif patlama ve NET oluşumunu artırabildiği de bildirilmiştir [106, 107, 153].

Behçet hastalığında NET'lerin oluşum hızında artış, makrofajlardan TNF-α ve CXCL8 salınımını arttırarak nötrofillerin aktivasyonunu ve vasküler endotelyal yüzeylere adezyonunu arttırmaktadır. Ayrıca salınan CXCL8, CD4 Th1 hücrelerinden IFN- γ üretimini arttırarak hem M1 tipte inflamatuvar makrofaj yanıtını güçlendirmekte hem de naif CD4 T hücrelerinin diferansiyasyon süreçlerini uyarmaktadır [143].

2.4.4. Behçet Hastalığında Vasküler Tutulumda Nötrofil Ekstrasellüler Tuzaklar

Behçet hastalığında vasküler tutulum, hastalığın en ciddi klinik fenotiplerinden biri olup, farklı çapta venöz ve arteriyel damarları etkileyebilen geniş bir klinik tabloyu temsil etmektedir. Vasküler lezyonlar içerisinde özellikle tekarlayan venöz trombozlar önemli bir yer tutarken histopatolojik incelemelerde trombüslerin damar duvarına güçlü şekilde yapışık olduğu ve inflamatuvar sürecin damar duvarının geniş segmentlerini etkileyebildiği gösterilmiştir. Bu bulgular Behçet hastalığında gelişen trombozların klasik tromboembolik olaylardan farklı bir patogenezle ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir [149, 154]. Klinik sonuçlara dayanarak Avrupa Romatizma Birliği (EULAR) tarafından yayımlanan önerilerde, Behçet hastalığında görülen venöz trombozların tedavisinde temel yaklaşımın immünsupresif tedavi olduğu, antikoagülan tedavinin her olguda rutin olarak önerilmediği belirtilmiştir. Bu öneri, vasküler lezyonların esas olarak inflamatuvar damar duvarı hasarı ile ilişkili olduğu görüşüne dayanmaktadır [155].

Bazı deneysel çalışmalar, Behçet hastalarından elde edilen NET yapılarının endotel hücrelerinin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebildiğini göstermiştir. Bu yapıların endotelyal hücrelerde proliferasyonu baskılayabildiği ve hücre ölümünü artırabildiği bildirilmiştir. Bunlar trombüs oluşumuna zemin hazırlayabilecek mekanizmalar arasında değerlendirilmektedir [156]. Tromboinflamatuvar yanıt sırasında aktive olmuş nötrofillerin, NADPH oksidaz aracılığıyla ürettiği yüksek miktarda ROS molekülleri, fibrinojen molekülünde oksitlenmeye bağlı değişikliklere yol açabilir. Ortaya çıkan oksidatif ortam; endotel hücrelerinde eksprese edilen ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin, doku faktörünün artmasına, çeşitli

inflamatuvar mediyatörlerin (çözünür CD40L, sitokinler vb) salınımına, nitrik oksit oluşum dengesinin bozulmasına ve fibrinolitik sistemin baskılanmasına yol açarak trombosit aktivasyonu ile birlikte membran lipidlerinde oksidatif hasarın artmasına yol açmaktadır. Bu olayların vasküler Behçet hastalığında görülen trombotik süreçlerin ortaya çıkmasında yeri olduğu değerlendirilmektedir [157, 158].

Behçet hastalığında NET oluşumunun vasküler tutulum ile ilişkili olabileceğini gösteren çeşitli bulgular bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada NET bileşenlerinin, özellikle cf-dsDNA ve MPO-DNA yapılarının, aktif hastalık döneminde arttığı ve vasküler tutulumu bulunan hastalarda daha yüksek düzeylerde saptanabildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada NET yapılarının parçalanmasının koagülasyon aktivitesini azaltabildiği gözlenmiştir. Bu veriler, NET oluşumunun yalnızca inflamatuvar süreçlerin bir sonucu olmadığını aynı zamanda tromboz gelişimini destekleyebilecek bir düzen oluşturarak pıhtılaşma mekanizmalarının güçlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [107]. Aynı şekilde vaskülitik inflamasyon ve tromboz alanlarında doku düzeyinde NET işaretlerinin gösterilmesi süreçteki rollerini desteklemektedir [107, 159].

Behçet hastalığında vasküler tutulumu olan veya olmayan hastalarda hastalık şiddetini belirlemede, hastalık aktivitesini ölçmede halihazırda kullanılan bir serum biyobelirteci bulunmamaktadır. Behçet hastalığında vasküler tutulumun patogenezinde inflamasyon, endotelyal disfonksiyon ve koagülasyon sisteminin aktivasyonu birlikte rol oynamaktadır. Bu süreçte nötrofil aktivasyonu ve NET oluşumu tromboinflamatuvar mekanizmaların önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle NET oluşumu ile tromboz gelişimi arasındaki ilişki son yıllarda araştırılmaktadır [160].

2.5. Tromboz ve NETosis

Fizyolojik hemostaz sırasında trombositler ile nötrofiller arasındaki etkileşimler önemli bir rol oynamaktadır. Normal koşullarda dolaşımda bulunan bu iki hücre tipi arasında belirgin bir temas oluşmaz ancak trombositlerin veya nötrofillerin aktive olması durumunda hücre–hücre etkileşimleri kolaylaşır. Aktivasyon sonrası trombositler granül içeriklerini salmakta ve yüzeylerinde lökositlerle etkileşimi sağlayan çeşitli adezyon moleküllerini eksprese etmektedir. Bu moleküller arasında yer alan P-selektin ve CD40 ligand, nötrofiller üzerinde bulunan karşılık gelen reseptörlerle

etkileşerek hücresel bağlantıyı güçlendirmektedir. Bu bağlantı integrinlerin aktivasyonuna ve hücre adezyonunun artmasına yol açabilmektedir. Aktive trombositler CCL5, CXCL4, CXCL5 ve CXCL7 gibi kemokinler başta olmak üzere çeşitli mediyatörlerin salınımı ile nötrofil fonksiyonlarını uyararak NET oluşumunu tetikleyebilmektedir [161].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, NET'lerin tromboz patogenezindeki rolüne ilişkin anlayışın önemli ölçüde değişmesine katkıda bulunmuştur [162-165]. Küresel ölçekte mortalite nedenleri arasında önemli bir yer tutan trombotik hastalıklar, hastalık yükünün önemli bir bölümünden sorumludur. Bu nedenle tromboz gelişiminin altında yatan mekanizmaların ayrıntılı biçimde anlaşılması, korunma ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Son dönemde elde edilen bulgular, NET yapılarının trombüs oluşumunda önemli rolleri olabileceğini göstermektedir. Gözlemsel çalışmalar, NET belirteçlerinin ve trombüs içi NET bileşenlerinin tromboinflamatuvar hastalıklarda arttığını desteklemektedir. İskemik inme, miyokard enfarktüsü ve derin ven trombozu gibi farklı klinik tablolarda elde edilen bu bulgular, NET oluşumunun tromboz patogenezine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [162, 165-169].

İmmünotromboz kavramı, doğuştan gelen bağışıklık yanıtı ile koagülasyon sisteminin birbirini karşılıklı olarak etkilediği biyolojik süreçleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu süreçte özellikle nötrofiller ve monositler gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri aktive olmakta ve çeşitli proinflamatuvar ile prokoagülan mediatörlerin salınımına yol açmaktadır. Nötrofiller tarafından oluşturulan NET'ler, DNA ve granül proteinlerinden oluşan ağ benzeri bir yapı oluşturarak trombositlerin, eritrositlerin ve çeşitli koagülasyon bileşenlerinin tutunabileceği bir ortam sağlar. Fibrinojen, von Willebrand faktör ve fibronektin gibi moleküllerin bu yapı üzerinde birikmesi, pıhtı oluşumunu kolaylaştırabilecek bir ortam oluşturur [12, 16, 17, 162, 170].

NET'lerin tromboinflamasyon sürecine etkileri farklı şekillerde gerçekleşebilir. Sitrülinlenmiş histon proteinleri, NET bileşenlerindeki proteolitik granül yapıları damar endotel hücrelerine hasar verirken, bu hücrelerde adezyon moleküllerinin sergilenmesini arttırır. Trombosit aktivitesini arttırır. Fibrin yapısını güçlendiren NET'ler dirençli

trombüs yapıları oluşumu sağlar. Doku faktörü ve faktör XII'ye bağlı her iki koagülasyon yolağını da aktive eder [18, 19].

NET oluşumu sırasında salınan PAD4 enzimi, ADAMTS13 üzerinde sitrülinasyon oluşturabilmekte ve bunun sonucunda von Willebrand faktörünün (vWF) proteolitik parçalanması azaltabilmekte, nötrofil elastaz (NE) doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) gibi bazı doğal antikoagülan proteinleri parçalayarak pıhtılaşma eğilimini arttırabilmektedir [20, 160].

Ayrıca koagülasyon sistemi ile kompleman sistemi arasında yakın bir etkileşim bulunduğu da bilinmektedir. Kompleman aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan özellikle C5a, nötrofillerin damar duvarına yönelmesini ve fonksiyonel olarak aktive olmasını artırabilmektedir. Bu süreçte aktive olmuş nötrofiller çeşitli hücresel sinyal yolakları aracılığıyla NET oluşumunu tetikleyebilmektedir. Özellikle trombin aracılı proteaz aktive reseptörlerin (PAR) uyarılması gibi mekanizmaların NET salınımını artırabileceği bildirilmektedir. Bu durum, inflamasyon, kompleman aktivasyonu ve koagülasyon süreçlerinin birbirini karşılıklı olarak güçlendirdiği bir sürece zemin hazırlayabilmektedir [171].

2.6. ANCA İlişkili Vaskülitlerin Genel Özellikleri

Sistemik vaskülitler, kan damarlarının inflamasyonu ve damar duvarında gelişebilen nekrotizan değişiklikler ile karakterize, birden fazla organ ve sistemi etkileyebilen heterojen bir hastalık grubunu ifade eder [172].

Vaskülitlerin sınıflandırılmasında zaman içinde farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu alanda ilk kapsamlı sınıflandırma çalışmaları 1990 yılında Amerikan Romatoloji Koleji (ACR) tarafından ortaya konulan tanı kriterleri ile yapılmıştır. Daha sonra 1994 yılında düzenlenen Chapel Hill Konsensus Konferansı (CHCC) ile vaskülitler, başlıca tutulan damar çapı ve histopatolojik özellikler temel alınarak yeniden sınıflandırılmıştır [173, 174]. Bu sınıflandırma sistemi 2012 yılında güncellenmiş ve yeni tanımlamalar eklenerek vaskülitlerin daha ayrıntılı bir şekilde ele alınması sağlanmıştır. Güncel sınıflandırmaya göre Behçet hastalığı farklı çapta damarları tutabilen değişken damar vaskülitleri arasında yer alırken, ANCA ilişkili vaskülitler ise çoğunlukla küçük damarları tutan vaskülitler grubunda değerlendirilmektedir [175].

Antinötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA) ile ilişkili vaskülitler, küçük damarları hedef alan ve sistemik inflamasyon sonucu çoklu organ tutulumuna neden olabilen otoimmün hastalıklar grubudur. Bu hastalık spektrumu içerisinde tanımlanan klinik tablolar arasında granülomatoz polianjiitis, mikroskopik polianjiitis ve eozinofilik granülomatöz polianjitis diğer adıyla Churg–Strauss sendromu yer almaktadır. En sık görülenleri granülomatöz polianjitis ve mikroskopik polianjitis olup, her iki hastalık da küçük damarları etkileyen nekrotizan vaskülit ile karakterizedir. Vasküler duvarda gelişen bu inflamatuvar süreç, farklı organ sistemleri (üst ve alt solunum yolları, böbrekler, akciğerler, santral ve periferik sinir sistemi, göz ve deri vb) etkileyebilme kapasitesine sahip olup hastalığın klinik spektrumu oldukça geniştir [176]. Pauci-immün özellik gösteren nekrotizan ve kresentik glomerülonefritin izole böbrek tutulumu şeklinde ortaya çıktığı olgular, mikroskopik polianjitisin sınırlı formları arasında görülebilmektedir. Granülomatoz polianjitis ile eozinofilik granülomatoz polianjitis bazı hastalarda sistemik yayılım göstermeksizin yalnızca solunum sistemi bulguları ile sınırlı bir klinik seyir sergileyebilmektedir [177].

ANCA ilişkili vaskülit (AAV) grubunda yer alan hastalıklar nadir görülmekte olup, epidemiyolojik veriler dünya genelinde belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu değişkenliğin hasta seçimi ve hasta kayıt veri tabanlarındaki farklılıklar, hastaların sınıflandırılması sırasında kullanılan yöntemlerin aynı olmamasından ve hastaların genetik özellikleri ve çevresel risk faktörlerindeki çeşitlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatür verilerinin çoğu Avrupa kökenli beyaz toplumlardan sağlanmış olup, en sık görülme yaş aralığı 65-74 olmakla birlikte çok daha geniş bir yaş aralığında ortaya çıktığı görülebilmektedir. Granülomatöz polianjitis ve mikroskopik polianjitis için prevalansın sırasıyla milyonda 2,3–140,0 ve 9–94,0 arasında değiştiği bildirilmektedir. İnsidans verileri de farklılık göstermekle birlikte AAV için yaklaşık 30,1/milyon yıllık insidans saptanmış, granülomatöz polianjitis (15,4/milyon) ve mikroskopik polianjitis (12,8/milyon) için birbirine yakın oranlar gözlenmiştir. Eozinofilik granülomatöz polianjitis insidansının çok daha düşük (1,8/milyon) olduğu görülmüştür [178, 179].

Epidemiyolojik çalışmalar, ANCA ilişkili vaskülitlerde cinsiyet dağılımının alt gruplara ve coğrafi bölgelere göre değişkenlik gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Genel olarak AAV'de hafif bir erkek cinsiyet baskınlığı olup, bu durum özellikle

granülomatöz polianjitis'te daha belirgindir. Birçok çalışmada mikroskopik polianjitis'in kadınlarda daha yüksek sıklıkta görüldüğü, bazı bölgelerde erkek hastalarda görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir. Bu farklılıkların altında yatan faktörler net olarak ortaya konulmasa da demografik ve bölgesel bazı etkenlerin rol oynayabileceği düşünülmektedir [180].

AAV grubunda yer alan hastalıklar için ailesel geçiş olguları bildirilmiş olsa da bu duruma nadiren rastlanmaktadır. Avrupa ve Kuzey Amerika kökenli popülasyonlarda yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, hastalığa yatkınlıkta rol oynayan bazı gen bölgelerinin varlığını ortaya koymuştur. Özellikle granülomatöz polianjitis HLA-DP varyantlarının yanı sıra, proteinaz 3'ü kodlayan PRTN3 ve bu enzimin temel inhibitörü olan α1-antitripsini kodlayan SERPINA1 genlerindeki polimorfizmler ile ilişkilidir. Alfa-1 antitripsin eksikliği ile ilişkili bazı genetik varyantların granülomatöz polianjitis hastalarında daha şiddetli bir klinik tablo ile bağlantılı olabileceği gösterilmiştir. PTPN22 ve CTLA4 gen bölgelerindeki polimorfizmlerin de AAV gelişimine yatkınlık oluşturabileceği bildirilmiştir. Bu veriler PR3-ANCA'nın yalnızca sekonder bir immün yanıt ürünü olmayıp hastalığın gelişim ve sürdürülmesinde aktif rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Mikroskopik polianjitis daha çok HLA-DQ gen bölgesi ile ilişkili bulunmuştur. Genetik bağlantıların, klinik alt tiplerden ziyade ANCA özgüllüğü ile daha güçlü korelasyon göstermesi de önem arz etmektedir [181, 182].

AAV gelişiminin tek bir nedene bağlı olmadığı, genetik yatkınlık ile çevresel uyaranların karşılıklı etkileşimi sonucu gelişen karmaşık bir süreç olduğu düşünülmektedir. Özellikle silika maruziyeti, hava kirliliği, kronik mikrobiyal kolonizasyon (*S.aureus* vb), ultraviyole ışın farklılıkları ve bazı farmakolojik ürünlerin doğal immün sistemi uyararak hastalık sürecini başlatabileceği veya mevcut immün reaksiyonların artaran devamına neden olabileceği düşünülmektedir [183, 184].

ANCA ilişkili vaskülitler sınıfında yer alan hastalıklarda nötrofil antijenlerine karşı oluşan otoantikorların immünfloresan mikroskop ile yapılan incelemelerde boyanma özellikleri tanısal açıdan önemlidir. İmmünfloresan boyamalarında sitoplazmik (c-ANCA) ve perinükleer (p-ANCA) olmak üzere iki ana boyanma paterni görülür ve bunlar genellikle sırasıyla proteinaz 3 (PR3) ve miyeloperoksidaz hedefli otoantikorları yansıtır. MPO ANCA'nın diğer hedef antijenleri arasında nötrofil

granüllerinde bulunan laktoferrin, lizozim, katepsin G ve elastaz gibi proteinler de yer almaktadır. Klinik olarak PR3 ANCA daha çok granülomatöz polianjitis ile ilişkiliyken, MPO-ANCA mikroskopik polianjitis ve eozinofilik granülomatoz polianjitis (EGPA) olgularında daha sık görülür. ANCA, granülomatöz polianjitis hastalarının yaklaşık %70–80'inde, mikroskopik polianjitis hastalarının ise %80–90'ında tespit edilirken; eozinofilik granülomatöz polianjitis'te ANCA pozitifliği %25-40 aralığında daha düşüktür. ANCA paternleri, hastalık alt tiplerinin ayrımında, klinik baskın özelliklerin ve komplikasyonların belirlenmesinde, hastaların immünsupresif tedavi ajanlarına verdikleri yanıtlarda önemli bir yere sahiptir [4, 185-187].

2.6.1. Granülomatöz Polianjitis Sınıflandırma Kriterleri ve Hastalık Aktivitesi

Granülomatoz polianjitis, granülomatöz inflamasyon ile nekrotizan vaskülitik süreçlerin birlikte izlendiği ve en sık solunum sistemi ile böbrekleri etkileyen ANCA ilişkili vaskülit alt tiplerinden biridir. Klinik tablo oldukça değişken olup bazı hastalarda sınırlı üst solunum yolu tutulumu ön plandayken, bazı olgularda hızla ilerleyen çoklu organ tutulumu gelişebilmektedir. Hastalığın başlangıcında halsizlik, kilo kaybı, ateş, artralji ve miyalji gibi sistemik inflamasyon bulguları görülebilir. Kulak burun boğaz tutulumu en sık başlangıç klinik bulgularından olup kronik rinosinüzit, nazal ülserasyon, epistaksis, iletim tipi işitme kaybı ve septal destrüksiyona bağlı semer burun deformitesi gelişebilmektedir. Akciğer tutulumu farklı radyolojik ve klinik paternlerle ortaya çıkabilmekte, nodüler infiltrasyonlar, kaviter lezyonlar, alveoler hemoraji ve trakeobronşial inflamasyon en sık görülen bulgular arasında yer almaktadır. Renal tutulum çoğunlukla pauci-immün nekrotizan ve kresentik glomerülonefrit şeklinde görülmekte olup mikroskopik hematüri, proteinüri ve progresif böbrek fonksiyon kaybına neden olabilmektedir. Bu bulguların dışında deri lezyonları, sklerit ve episklerit gibi oftalmolojik bulgular, periferik nöropati, mononöritis multipleks ve kas-iskelet sistemi yakınmaları hastalık seyrinde ortaya çıkabilmektedir. Klinik tutulum dağılımı değerlendirildiğinde üst solunum yolu bulgularının yaklaşık %70–100, akciğer tutulumunun %60–90 ve böbrek tutulumunun %50–80 oranında görüldüğü bildirilmektedir [188, 189].

Granülomatoz polianjiitis için 2022 yılında ACR/EULAR tarafından geliştirilen güncel sınıflandırma kriterleri klinik bulguların yanı sıra laboratuvar verileri, histopatolojik özellikler ve görüntüleme bulgularını içeren bir değerlendirme

önermişlerdir. Özellikle PR3-ANCA pozitifliği, üst solunum yolu tutulumu, akciğer nodülleri veya kaviter lezyonların varlığı ile biyopside granülomatöz inflamasyon gibi bulgular sınıflandırmada önemli yer tutmaktadır. Farklı alanlardan elde edilen toplam skorun 5 veya üzerinde olması, Granülomatöz polianjitis olarak sınıflandırma için yeterli kabul edilmektedir [190].

ANCA ilişkili vaskülitlerde hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi; klinik izlem ve tedavi kararlarının belirlenmesinde, gelişebilecek organ hasarına ait bulguların erken dönemde tespit edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan araçlardan biri "Birmingham Vaskülit Aktivite Skoru (BVAS)" olup; vaskülitlerde hastalığa bağlı yeni ortaya çıkan veya yakın zaman aralığında kötüleşen klinik bulguların farklı organ sistemlerine göre puanlanmasını sağlayan standart hale getirilmiş bir değerlendirme sistemidir. Bu skor genel durum, kutanöz, mukozal, göz, kulak-burun-boğaz, kardiyovasküler, pulmoner, abdominal, renal ve sinir sistem tutulumuna dair bulgularını içeren çok sayıda klinik verinin değerlendirilmesine dayanır. Bu ölçekte skorlama yapılırken sadece aktif vaskülitik tutulumla ilişkili bulgular dikkate alınmakta olup, kalıcı organ hasarı ile ilgili bulgular bu skorlama ölçeğine dahil edilmemektedir. Elde edilen toplam skor hastalığın aktivite düzeyini yansıtmakta olup yüksek skorlar daha aktif hastalığı göstermektedir. ANCA ilişkili vaskülitlerde tanı esnasında saptanan yüksek BVAS skorlarının daha ağır hastalık seyri ve artmış mortalite riski ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Yaygın olarak kullanılan BVAS versiyon 3 (BVAS v3) dışında, granülomatöz polianjitise özgü klinik bulguların daha ayrıntılı değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen BVAS/WG (Birmingham Vasculitis Activity Score for Wegener's Granulomatosis) formu da kullanılmaktadır [191]. Güncel literatürde Wegener granülomatozisi yerine granülomatöz polianjitis terminolojisi kullanıldığı için bu form sıklıkla BVAS/GPA olarak adlandırılmaktadır. Özellikle granülomatöz üst hava yolları bulguları, orbital inflamasyon ve nodüler karakterde akciğer tutulumları gibi granülomatöz polianjitis'e özgü klinik özelliklerin değerlendirilmesinde BVAS/GPA'nın daha yararlı olabileceği düşünülmektedir [192-194].

2.6.2. ANCA İlişkili Vaskülitlerin İmmünopatogenezinde Nötrofiller ve NETosis

Antinötrofil sitoplazmik antikor (ANCA) ilişkili vaskülit (AAV) grubunda yer alan hastalıklarda esas olarak nötrofil granüllerinde yer almakla birlikte monosit ve

makrofajlar tarafından da üretilebilen PR3 ve MPO otoantijenlerini hedef alan otoimmün mekanizmaların patogenezde önemli rolü bulunmaktadır. PR3, nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan ve prekürsör ile olgun formları olan bir serin proteazdır. Proteolitik etkileri sayesinde ekstraselüler matriks ve bazal membran bileşenlerinin yıkımına katkıda bulunarak nötrofillerin damar dışına geçişini ve doku infiltrasyonunu kolaylaştırabilmektedir. Hücre yüzeyindeki ekspresyonu değişken olup kısmen CD177 ile birlikte görülür. Apoptoz sürecine giren nötrofillerde yüzey PR3 düzeyinin artması, bu hücrelerin uzaklaştırılmasını güçleştirerek inflamatuvar sürecin devamına zemin hazırlayabilir. Aktif granülomatöz polianjitis döneminde nötrofil yüzeyindeki PR3 ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı ve bu artışın inflamatuvar hastalık aktivitesi ile paralellik gösterebildiği bildirilmektedir. MPO da PR3 gibi nötrofil primer granüllerinde katyonik bir enzim olup, inflamatuvar ortamda peroksit varlığında klorür gibi anyonları kullanarak hipokloröz asit başta olmak üzere güçlü oksidan moleküllerin oluşumunu sağlar. Bu reaktif oksidan ürünler dokularda halojenasyon oluşturup doğrudan sitotoksisiteye yol açabilir. Deneysel tasarımlarda, MPO'nun uygun oksidatif koşullarda uygulanması ile kapiller düzeyde belirgin endotel hasarı ve nötrofil, trombosit gibi hücrelerin dokuda birikiminin geliştiği gösterilmiştir [195-197].

ANCA ilişkili vaskülitlerin immünopatogenezinde nötrofiller, kompleman sistemi ve adaptif immün yanıtın bileşenleri birlikte rol oynamaktadır. Nötrofillerin aktivasyonu ve NET oluşumu bu süreçte merkezi bir yere sahiptir. İnflamatuvar sitokinler ve diğer uyarıcılar etkisiyle "priming" sürecine giren nötrofillerde MPO ve proteinaz-3 (PR3) gibi ANCA hedef antijenleri hücre yüzeyinde daha belirgin hale gelir. Genellikle IgG izotipinde olan ANCA'ların söz konusu antijenlere bağlanması ve aynı zamanda Fc bölgeleri aracılığıyla nötrofiller üzerindeki Fcγ reseptörleri ile etkileşime girmesi hücre içi çeşitli sinyal yolaklarını aktive ederek nötrofillerde adezyon moleküllerinin sentez ve sergilenmesinde artış, NADPH oksidaz aracılı ROS oluşumunda artış, PAD4 enziminin aktive edilmesi ile kromatin ağının gevşetilmesi ve nihayetinde MPO ve nötrofil elastaz gibi proteolitik enzimlerin hücresel membran bütünlüğünü bozması ile NET oluşumuna neden olur [7, 184, 195, 198].

ANCA'nın nötrofil aktivasyonunda FcγRIIa (CD32A) ile etkileşiminin kritik olduğu, bu reseptörün yüksek yanıtla ilgili polimorfizmine sahip kişilerde nötrofillerin

ANCA ile uyarımına çok daha belirgin ROS üretimi ile yanıt verdikleri *in vitro* şartlarda gösterilmiştir. Nötrofil yanıtının özelliği ve şiddetindeki farklılıkların, yalnızca reseptör düzeyleri ile ilişkili olmayıp ANCA'nın hedef epitoplarına ve yapısal özelliklerine, Fcγ reseptörlerine ait genetik varyasyonlar ile antikorların immünokimyasal özellikleri olan alt tip, izotip ve Fc bölgesindeki glikozilasyon paternlerine bağlı olduğu düşünülmektedir [197, 199]. Epitop düzeyinde yapılan incelemeler, MPO'ya karşı ANCA yanıtının her zaman aynı olmadığını; belirli hedef bölgeleri tanıyan alt tiplerin hastalık aktivitesiyle daha çok ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca B hücrelerini hedef alan Rituksimab tedavisi sonrasında ANCA düzeylerinde düşüş görülüp buna klinik düzelmenin eşlik etmesi, bu konudaki kanaati desteklemektedir [200].

AAV hastalarında vaskülitik hasarın geliştiği doku ve organlarda NET oluşumunun varlığı gösterilmiştir. Klinik açıdan en çarpıcı örnek, erken tanı ve tedavi sağlanmadığında hızla ilerleyerek kalıcı organ kaybına ve son dönem böbrek yetmezliğine yol açabilen, kresentik glomerülonefrit ile seyreden renal tutulumdur. Bu süreçte yapılan böbrek biyopsilerinde immün kompleks birikiminin minimal olduğu "pauci-immün" bir inflamasyon izlenirken, lezyon alanlarında ANCA aracılı olarak uyarılmış nötrofil ve monositlerin birikimi ön plandadır. Bu hücrelerin oluşturduğu yoğun oksidatif stres, granül içeriklerinin kontrolsüz salınımı ve kromatin ağlarının dış ortama bırakılması, doku hasarını arttıran ve inflamasyonun devamına yol açan bir sürece yol açmaktadır [196, 201]. Hayvan çalışmalarında NET kaynaklı PR3 ve MPO'nun dendritik hücrelere aktarılabildiği gösterilmiş ve bu antijenleri taşıyan dendritik hücreler ile yapılan immünizasyon sonrasında farelerde ANCA oluşumu ve renal hasar geliştiği bildirilmiştir. Bu bulgular, NETosisin AAV gelişiminde otoantijen sunumunu kolaylaştırarak otoimmün sürecin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini desteklemektedir [187].

T hücrelerinin AAV immünopatonegezinde önemli bir yeri olup, granülomatöz polianjitis'te artmış T hücre aktivasyonu; $CD4^+$ Th1 kaynaklı IFN-γ ile inflamatuvar M1 tipte makrofaj yanıtını güçlendirirken, Th17 hücrelerinden salınan IL-17'nin IL-1β ve TNF-α üretimini tetiklemesi inflamasyonu sürdürür. Düzenleyici T hücreler (Treg) ile Th1, Th2 ve Th17 hücre yanıtları arasındaki immün dengenin bozulması, proinflamatuvar sitokin yanıtını güçlendirerek otoimmün inflamasyonun sürmesine katkıda bulunmaktadır. Bu süreçte aktive olan nötrofiller tarafından oluşturulan

oksidatif mediyatörler damar endoteline zarar verebilmekte; sonuçta kresentik nekrotizan glomerülonefrit başta olmak üzere vaskülitik doku hasarı ve granülomatöz inflamatuvar lezyonların gelişiminde rol oynayabilmektedir [182, 184]. Ayrıca granülomatöz polianjitis'te dokuya göç eden nötrofillerde, lökositoklazi ile uyumlu olarak nükleer yoğunlaşma ve parçalanma bulguları dikkat çeker. Bu durum lezyonların nekrotizan özelliğini ortaya koyarken, aynı zamanda gelişen mikroapselerin granülomatöz inflamasyona dönüşmesine zemin hazırlamaktadır [202].

NET bileşenlerinin antijen sunucu hücreler tarafından işlenip T hücrelerine sunulması sonucunda B hücreleri uyarılarak yeni ANCA üretimi tetiklenir. Böylece NET oluşumu ile otoantikor üretimi arasında karşılıklı olarak birbirini güçlendiren bir inflamatuvar döngü ortaya çıkar. NET'lerin ANCA ilişkili vaskülitin ilerlemesine katkısı birden fazla patofizyolojik mekanizma ile açıklanmaktadır. NET bileşenleri özellikle içerdikleri histonlar aracılığıyla endotelyal hücrelerde hasara yol açabilir. Bunun yanı sıra NET yapılarının kompleman sisteminin alternatif yolunu aktive ederek özellikle C5a bileşeni üzerinden nötrofil aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir [7, 198].

Aktif ANCA ilişkili vaskülit hastalarında dolaşımdaki NET düzeylerinin hem remisyon dönemindeki hastalara hem de sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve AAV hastalarından elde edilen nötrofillerde spontan nötrofil hücre ölümü eğiliminin arttığı bildirilmiştir [5]. Başka bir çalışmada ise NET oluşumundaki artışın ANCA gelişimini destekleyebileceği gösterilmiştir [90]. NET içeriklerinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, AAV hastalarında SLE ile kıyaslandığında hastalık aktivitesi ile ilişkili, sitrüline histon H3 bakımından zengin ve IgG'den bağımsız suisidal NET oluşumunun daha belirgin olduğu saptanmıştır [92]. Grayson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada AAV hastalarının periferik kan hücrelerinde yapılan gen ekspresyon analizlerinde MPO ve PR3 genlerini içeren belirgin bir nötrofil gen imzası tanımlanmıştır. Bu gen ekspresyon profilinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu ve tedavi sonrası azaldığı gösterilmiştir. Aynı gen imzasının periferik kan mononükleer hücre fraksiyonunda da saptanması, AAV'de dolaşımda düşük dansiteli nötrofillerin bulunduğunu düşündüren önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir [203].

Bununla birlikte, bu konuda tüm çalışmalar birbiriyle tam uyumlu değildir. Örneğin Wang ve arkadaşlarının çalışmasında NET düzeyleri ile hastalık aktivitesi

arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış ve hastalığın aktif ve remisyon dönemleri arasında dolaşımdaki NET düzeyleri açısından fark bulunmamıştır [204]. Ayrıca bazı veriler, AAV'de düşük dansiteli nötrofillerin özgün bir aktivasyon fenotipinden çok, artmış granülopoez sonucunda dolaşıma çıkan ve olgunlaşmamış nötrofilleri de içeren heterojen bir hücre grubunu yansıtabileceğini düşündürmektedir [205].

Çalışma sonuçlarındaki tutarsızlıkların; bireyler arasındaki NET klirens kapasitesindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan AAV patogenezinde yalnızca NET oluşumunun artışı değil, aynı zamanda NET'lerin etkili biçimde uzaklaştırılamaması da önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Serum DNaz I aktivitesindeki azalma NET'lerin dolaşımda ve dokularda daha uzun süre kalmasına ve birikmesine yol açabilir. Nitekim böbrek biyopsilerinde DNA, MPO ve PR3'ün birlikte lokalize olduğunun gösterilmesi, inflamatuvar dokularda NET varlığını destekleyen önemli histopatolojik bulgulardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle NET kökenli biyobelirteçlerin hastalık aktivitesini yansıtma kapasitesi henüz tam olarak standardize edilmemiş olup, klinik kullanım potansiyelleri halen araştırılmaya devam etmektedir [7].

2.7. Antifosfolipid Sendromunun Klinik, Serolojik ve Epidemiyolojik Özellikleri

Primer antifosfolipid sendromu antifosfolipid antikorların aracılık ettiği aracılık ettiği trombotik ve inflamatuvar süreçlerin ön planda olduğu, trombotik olaylar ile gebelik ve lohusalık dönemine ait komplikasyonlarla seyreden birçok organ sistemini etkileyebilen bir klinik tablodur [206].

İlk olarak SLE olgularında tanımlalan antifosfolipid sendromu terminolojisinde; eğer zeminde bir majör otoimmün hastalık varsa sekonder antifosfolipid sendromu , bu hastalıkların olmadığı kişilerde tek başına ortaya çıkıyorsa primer antifosfolipid sendromu denilmektedir. Primer antifosfolipid sendromu, edinilmiş tromboz eğiliminin önemli nedenlerinden biri olarak; özellikle venöz tromboemboli, genç yaşta gerçekleşen serebrovasküler olaylar ve istenmeyen gebelik olayları ile ilişkilendirilmektedir. Antifosfolipid sendromu olarak sınıflandırılan hastaların hepsinde, SLE hastalarının yaklaşık üçte birinde saptanan antifosfolipid antikorlara bağlı ortaya çıkan antifosfolipid sendromu tablosunda klinik bulgu; yüzeyel ven trombozundan çoklu organ yetmezliği ile seyreden katastrofik antifosfolipid sendromu tablosuna kadar farklı şekillerde karşımıza çıkabilmektedir [207].

Antifosfolipid sendromunda epidemiyolojik çalışma verilerine göre; yıllık insidansının yaklaşık 1–2/100.000, prevalansının 40–50/100.000 düzeyinde olduğu bildirilmektedir. Hastalık çoğunlukla orta yaş erişkinlerde ve kadınlarda tanı almaktadır. Ancak primer trombotik antifosfolipid sendromu olgularında kadın-erkek dağılımının daha dengeli olduğu görülmektedir. Antifosfolipid sendromu klinikte en sık venöz tromboembolik olaylar ile karşımıza çıkarken, genç yaşta görülen serebrovasküler olaylar ve gebelik ve lohusalık dönemini ilgilendiren komplikasyonlar da hastalığın önemli klinik özellikleri arasında yer almaktadır [208].

Antifosfolipid sendromunun genetik temeli net olarak aydınlatılamasa da hastalık gelişiminde çevresel faktörlerle birlikte bazı genetik yatkınlık faktörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle HLA sınıf II allelleri, immün yanıt ve otoantikor üretiminde rol oynayan STAT4, IRF5, BLK ve β2-glikoprotein I'i kodlayan APOH/B2GP1 genleri ile hastalık gelişim süreçleri arasında ilişki bildirilmiştir [209].

Antifosfolipid antikorlar (aPLA); anyonik fosfolipidler, fosfolipid-protein kompleksleri ve özellikle β2-glikoprotein I gibi fosfolipid bağlayıcı proteinlere karşı gelişen otoantikorları içermektedir. Bu antikorların ELISA temelli testlerde fosfolipidleri tanıyabilmesi çoğunlukla kofaktör proteinlerin ortamdaki varlığına bağımlıdır. Antifosfolipid sendromunda tromboz gelişiminden sorumlu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte; endotelyal hücre aktivasyonu ve prokoagülan yanıtın artması, adezyon molekülleri ve doku faktörü ekspresyonunda belirgin yükselme, trombosit aktivasyonu ve tromboksan A2 üretiminde artış, doğal antikoagülan sistemlerin baskılanması, fibrinolizin inhibisyonu, anneksin V kaybına bağlı protrombotik eğilim ve kompleman aktivasyonu gibi çok sayıda tromboinflamatuvar sürecin rol oynadığı düşünülmektedir [210, 211].

Antifosfolipid sendromu sınıflandırma kriterlerinde yer alan antifosfolipid antikorların belirlenmesinde; antikardiyolipin ve anti-β2 glikoprotein I antikorlarının IgM ve IgG izotipleri ELISA yöntemiyle ölçülürken; lupus antikoagülanının (LA) fosfolipid bağımlı pıhtılaşma testleri aracılığıyla fonksiyonel olarak tespit edilmektedir [212, 213]. Lupus antikoagülanı değerlendirmesi; genellikle tarama, karışım ve doğrulama basamaklarından oluşan çok aşamalı koagülasyon testleri ile yapılmaktadır. Bu amaçla en sık dilute Russell viper venom testi (dRVVT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Tarama testlerinde

uzayan pıhtılaşma süresinin, yüksek fosfolipid içeren doğrulama testleri ile düzelmesi lupus antikoagülanı varlığını destekleyen temel bulgu olarak kabul edilmektedir [213].

Antifosfolipid sendromunda tromboz riski ve istenmeyen gebelik olayları gelşimi açısından yüksek riskli hasta gruplarının belirlenmesi, tedavi planlanması ve prognoz açısından önem arz etmektedir. Özellikle lupus antikoagülanı (LA) pozitifliği, çoklu antifosfolipid antikor pozitifliği ile serumda persiste eden yüksek düzeydeki antifosfolipid antikorlarının varlığı, eşlik eden otoimmün hastalıklar, özellikle SLE varlığı, daha önce yaşanan tromboz yada gebelik komplikasyonlarının varlığı ve bilinen klasik kardiyovasküler risk faktörleri (hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabetes, kronik böbrek yetmezliği, obezite, sigara vb) hastalarda antifosfolipid sendromu ilintili komplikasyonların görülme riskini arttırmaktadır [206, 212].

2.7.1. Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterleri

2006 yılında duyurulan Revize Sapporo (Sidney) sınıflandırma kriterleri, antifosfolipid sendromunun tanımlanmasında günümüzde en yaygın kullanılan sınıflandırma kriterlerinden birini oluşturmaktadır. Bu kriterlere göre Antifosfolipid sendromu sınıflandırması için, en az bir klinik bulgunun (vasküler tromboz veya gebelik morbiditesi) yanı sıra kalıcı antifosfolipid antikor pozitifliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Laboratuvar değerlendirmesinde lupus antikoagülanı, antikardiyolipin antikorları ve anti-β2 glikoprotein I antikorlarının en az 12 hafta arayla iki ayrı ölçümde pozitif saptanması esas alınmıştır. Bu sayede geçici veya yalancı antikor pozitifliklerinden ziyade persiste eden antifosfolipid antikorların varlığının gösterilmesi önemli hale getirilmiştir [214] (Tablo 1).

Tablo 1. **Revize Sapporo (Sidney) Antifosfolipid Sendromu sınıflandırma kriterleri [214]**

Klinik kriterler	**Tanım**
Vasküler tromboz	Arteriyel, venöz veya küçük damar trombozu (en az 1 defa) (görüntüleme veya patoloji ile doğrulanmalıdır)
Gebelik morbiditesi	<10. gebelik haftasında ardışık en az üç spontan abortus (anatomik, hormonal ve genetik nedenler dışlanmış) ≥10. gebelik haftasında morfolojik olarak normal fetusun açıklanamayan ölümü <34. gebelik haftasında şiddetli preeklampsi, eklampsi veya plasental yetmezlik nedeniyle erken doğum
Laboratuvar kriterler	
Antikardiyolipin IgM veya IgG pozitifliği	IgG ve/veya IgM; orta-yüksek titre (≥40 GPL/MPL veya >99. persantil)

Anti β2 gikoprotein I IgM veya IgG pozitifliği	IgG ve/veya IgM >99. persantil
Lupus antikoagülanı pozitifliği	ISTH kriterlerine göre pozitiflik

Açıklamalar: Kesin tanı için en az 1 klinik ve 1 laboratuvar kriter birlikte olmalıdır. Antifosfolipid antikorların tek ölçümde pozitif olması yeterli olmayıp, persiste eden (en az 12 hafta ara ile) antikor pozitifliği anlamlıdır. ISTH: Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği.

2023 ACR/EULAR antifosfolipid sendromu sınıflandırma kriterleri, Revize Sapporo kriterlerinden farklı olarak değişik ağırlıklardaki puanlamalar ile derecelendirilmiş ve klinik ve laboratuvar parametreleri içeren domain bazlı bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Bu kriterlerde giriş kriteri olarak, klinik bulgular ile ilişkili en az bir antifosfolipid antikor (aPLA) pozitifliğinin gösterilmesi gerekmektedir. Hastalar; venöz, arteriyel dolaşım sistemlerinde makrovasküler ve mikrovasküler tromboz, obstetrik bulgular, kalp kapak tutulumu ve hematolojik bulguları içeren klinik domainler ile lupus antikoagülanı, antikardiyolipin ve anti-β2 glikoprotein I antikorlarını içeren laboratuvar domainleri üzerinden belirlenen puanlama sistemi ile değerlendirilmektedir. Antifosfolipid sendromu olarak sınıflandırılabilmesi için hastaların klinik ve laboratuvar alanlarının her birinden en az 3 puan alması gerekmektedir. Bu yeni sınıflandırma sistemi, antifosfolipid sendromunun farklı organ ve sistemlere ait klinik tutulumlarını daha iyi yansıtmayı ve sınıflandırma doğruluğunu arttırmayı planlayarak düzenlenmiştir [212].

Antifosfolipid sendromunda sınıflandırma kriterleri dışında kalan bazı klinik tutulum bulgularının (trombositopeni, antifosfolipid sendromu ilişkili nefropati vs) varlığı tespit edilerek bunlar kriter dışı bulgular olarak adlandırılmıştır. Sınıflandırma kriterlerinde yer almayan klasik antifosfolipid antikorları dışında farklı otoantikor tiplerinin de hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir [208].

2.7.2. Antifosfolipid Sendromu İmmünopatogenezi

Antifosfolipid antikorlarına sahip olan tüm hastalarda arteriyel yada venöz sistemde kan akışının bozulmasına yol açan trombüs oluşum süreçlerinin görülmemesi, bu antikorları taşımanın trombotik olaylarının gelişimi için yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bu nedenle hastalıkta, altta yatan tromboinflamatuvar ortama eklenen inflamasyon, enfeksiyon, cerrahi uygulama veya travma gibi ek tetikleyici faktörlerin trombotik olayların ortaya çıkmasında belirleyici rol oynadığı düşünülmektedir [207].

β2-glikoprotein I (β2GPI); beş yapısal domainden oluşan, kompleman kontrol protein süper ailesi içerisinde sınıflandırılan bir plazma glikoproteinidir. Normal fizyolojik koşullarda dolaşımda çoğunlukla kapalı halkasal yapısal formda bulunan β2GPI'nin; hemostatik süreçler, damar gelişimi ve hücresel artıkların uzaklaştırılması gibi çeşitli hücresel olaylarda görev aldığı düşünülmektedir. β2GPI'nin beşinci domeni anyonik fosfolipidlere bağlanırken, bu etkileşim sonrasında birinci domendeki immünojenik epitopların açığa çıkarak, otoantikorların bağlanmasının sağlandığı bilinmektedir. Oluşan anti-β2GPI immün komplekslerinin endotel hücreleri, monositler ve trombositleri stimüle etmesi sonucunda doku faktörü ekspresyonunda, adezyon moleküllerinde ve proinflamatuvar sitokin üretiminde artış görülmektedir [215, 216]. Son yıllarda antifosfolipid sendromu patogenezinde doğal immün sistem hücrelerinde Toll benzeri reseptör (TLR) aracılı sinyallerin önemli rol oynadığı; anti-β2 glikoprotein I komplekslerinin TLR2 ve TLR4 üzerinden MAPK ve NF-κB sinyal yolaklarını aktive ederek inflamasyonu arttırdığı gösterilmiştir [207].

Antifosfolipid antikorlarının kompleman sisteminin özellikle klasik yolunu aktive ederek C5a oluşumunu arttırdığı; bunun sonucunda nötrofiller, monositler, damar endotel hücreleri ve trombositlerin aktivasyonunun uyarıldığı gösterilmiştir. Bu esnada reaktif oksijen ürünleri, TNF-α başta olmak üzere proinflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri ve kompleman proteinlerinde artış ile oluşan inflamatuvar yanıt endotel hücre fonksiyonlarındaki bozulmayı ve protrombotik olayları arttırmaktadır [211, 217].

Antifosfolipid sendromunda antifosfolipid antikorlarının yalnızca koagülasyon sistemini değil, aynı zamanda trombositleri ve doğal immün yanıt hücrelerini etkileyerek tromboz eğilimini arttırdığı düşünülmektedir. Bu otoantikorların trombosit membran proteinleri ve adezyon reseptörleri ile etkileşimi sonucunda trombosit agregasyonu kolaylaşırken trombositler aktive olmaktadır. Dendritik hücrelerde ve monositlerde immün kompleksler aracılığıyla gelişen TLR7 ilişkili sinyaller, interferon aracılı inflamatuvar yanıtı teşvik ederek tromboz gelişimine katkıda bulunmaktadır. Antifosfolipid sendromu hastalarında dolaşımda artmış çözünür CD40L ve trombosit kaynaklı kemokin düzeylerinin gösterilmesi, trombositlerin aktive olduğunu destekleyen önemli göstergeler arasında düşünülmektedir [218].

Antifosfolipid sendromu patogenezinde edinsel immün yanıtın da önemli bir yeri bulunmaktadır. Özellikle enfeksiyon veya hücresel hasar sonrası ortaya çıkan

apoptotik hücre kalıntıları üzerinde β2GPI-fosfolipid komplekslerinin açığa çıkması, normalde immün sistem tarafından tanınmayan epitopların görünür hale gelmesine neden olarak otoimmün sürecin başlamasında rol oynayabilmektedir. Antijen sunan hücreler aracılığıyla aktive olan $CD4^+$ T hücre yanıtı; Th17 ve Th2 yönüne deviye olurken, düzenleyici T hücre aktivitesindeki azalma immün tolerans kaybını arttırmaktadır. Bu ortam B hücre aktivasyonunu ve antifosfolipid antikorlarının oluşumunu hızlandırmaktadır [219].

2.7.3. Antifosfolipid Sendromunda Tromboz, Nötrofiller ve NETosis

Antifosfolipid sendromunda nötrofillerin belirgin proinflamatuvar özellikler kazandığı ve interferon ilişkili gen ekspresyonu ile adezyon moleküllerinin arttığı gösterilmiştir. P-selektin glikoprotein ligandı-1 (PSGL-1/CD162) ekspresyonundaki artışın, nötrofillerin damar endoteline tutunmasını kolaylaştırarak vasküler tromboz gelişimine katkıda bulunacağı bildirilmektedir. NET yapılarının, damar yatağında trombosit kümelenmesi için uygun bir ortam oluşturabildiği; endotel hücre aktivasyonu hızlandırarak damar duvarındaki inflamatuvar yanıtın devam etmesine yol açtığı düşünülmektedir. Primer antifosfolipid sendromu hastalarında düşük dansiteli nötrofillerin sayısal olarak arttığı gösterilmiş olsa da, bu nötrofil alt grubunun tromboz gelişimi ve hastalık aktivitesi üzerindeki etkileri halen tam olarak ortaya konulamamıştır [46].

Yalavarthi ve ark., antifosfolipid sendromunda antifosfolipid antikorlarının nötrofilleri daha fazla NET oluşumuna yönlendirerek tromboz gelişme sürecine katkı sağladığını göstermiştir. Antifosfolipid sendromu hastalarının serum ve plazmasında NET bileşenleri ile cf-dsDNA düzeylerinin arttığı, ayrıca hastalardan elde edilen nötrofillerin uyarıma tabi olmaksızın kendiliğinden NETosis eğiliminin belirgin olduğu belirlenmiştir. Oluşan NET yapılarının, fibrin pıhtılarının oluşumunu sağlayacak olan trombinin üretimini desteklediği bildirilmiştir. Antifosfolipid antikorların uyardığı NETosisin ROS üretimi ve TLR4 sinyal yolakları ile bağlantılı olduğu; anti-β2GPI antikorlarının endotelyal hücreler, monositler ve trombositlerde doku faktörü ve proinflamatuvar sitokin üretimini arttırdığı bilinmektedir. Annexin A2 ve TLR4'ün bu aktivasyon süreçlerinde önemli eş reseptörler olduğu bildirilmektedir [220].

Nayak ve ark. tarafından yapılan deneysel çalışmalarda, antifosfolipid antikorlarına maruz kalan insan ve fare nötrofillerinde belirgin aktivasyon ve NETosis

yönünde hücresel olaylar gösterilmiş; bu durumun hem arteriyel hem de venöz tromboz gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca nötrofil fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan Kruppel-like factor 2 (KLF2) düzeylerindeki değişimlerin, PSGL-1 ekspresyonunu artırarak nötrofillerin trombotik damar yüzeylerine tutunmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir [221].

Antifosfolipid sendromu hastalarında, NET yıkım kapasitesinin azalmasının ve dolaşımdaki NET oluşumlarının yeterince temizlenememesinin, inflamatuvar ve trombotik süreçlerin devamına katkı sağlayabileceğine dair veriler bulunmaktadır [222]. NET'lerin DNaz enzimatik aktivitesi ile parçalanması veya nötrofillerin azaltılması sonrasında trombozun gerileme eğiliminde olması bu kanıyı desteklemektedir [223].

Antifosfolipid sendromunda NETosis'in trombotik süreçlerle ilişkisini destekleyen çeşitli çalışma verileri bulunmaktadır. NET yapılarına karşı gelişen anti-sitH3 ve anti-NET antikorlarının tromboz sıklığı ile ilişkili bulunması ve bu otoantikorların NET yıkımını bozabilmesi, NET'lerin dolaşımda kalma sürelerini arttırarak tromboinflamatuvar sürece katkıda bulunmaktadır. Antifosfolipid sendromlu hastaların serumlarından izole edilen immünglobulinler ile oluşturulan deneysel modellerde artmış tromboz eğilimi ve sitrülinlenmiş histon H3 ve cf-dsDNA düzeylerinde artış saptanması NETosis'in antifosfolipid sendromu patogenezindeki rolünü desteklemektedir [58, 223].

Son yıllarda NETosis'i hedefleyen tedavi yaklaşımlarının antifosfolipid sendromunda pıhtılaşmaya giden yolu engelleyebileceğine dair veriler artmaktadır. Adenozin A2A reseptör agonistleri ve adenozin sinyalini güçlendiren dipiridamolün, antifosfolipid antikor aracılı nötrofil aktivasyonunu ve NET oluşumunu azaltarak tromboz gelişimini yavaşlatabildiği; benzer şekilde antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip taxifolin'in, oksidatif stres yanıtında görevli mekanizmaları aktive ederek NET oluşumunu ve tromboinflamatuvar yanıtı azaltabildiği ortaya konulmuştur [224, 225].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları ve Katılımcı Seçimi

Çalışmamıza hasta grubu ve hastalıklı kontrol grupları olarak İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı ve İstanbul Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi Romatoloji kliniğinden takipli; 2014 yılında revize edilen Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterlerine (ICBD) göre tanı konulmuş, vasküler trombozu tespit edilen Behçet hastaları (n=8), 2006 Revize Sapporo (Sidney) Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterleri'ne göre primer antifosfolipid sendromu tanısı olup yeni tespit edilmiş vasküler trombozu saptanan hastalar (n=8), vaskülit kontrol grubu olarak ACR/EULAR 2022 Granülomatöz Polianjitis Sınıflandırma Kriterlerine göre yeni tanı konulmuş aktif granülomatöz polianjitis tanısı olan hastalar (n=8) ve son olarak etiyolojisi tam olarak ortaya konulamamış, herhangi bir romatolojik hastalıkla ilişkisi gösterilememiş vasküler trombozu olan hastalar (n=8) dahil edilmiştir. Çalışma için seçilen tüm hastaların tanıları genel bilgiler bölümünde paylaşılan güncel bilimsel verilere dayalı olarak konulmuştur [23, 190, 214]. Vasküler Behçet hastalarının genel hastalık aktivite skorunu yansıtan değerlendirme, genel bilgiler kısmında ve formlar bölümünde yer verilen Behçet Hastalığı Güncel Aktivite Formu (BDCAF) içeriğinde yer alan parametrelere göre hesaplanmıştır [139].

Çalışmaya alınan hastaların hepsi; tedavi naif, yeni hastalık tanısı konulmuş hastalardan oluşmaktadır.

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Revize ICBD 2014 kriterlerine göre [23] Behçet hastalığı tanısı almak, radyolojik veya histopatolojik gösterilmiş vasküler tromboza sahip olmak
- 18 yaş ve üzerinde olmak
- Bilinen ek romatolojik veya bağışıklık sistemi hastalığı olmamak.
- Çalışma öncesinde steroid dahil immünsupresif bir tedavi ajanı ve herhangi bir antikoagülan tedavi almamak

Hastalıklı kontrol gruplarının dahil edilme kriterleri:

- ACR/EULAR 2022 Granülomatöz Polianjitis Sınıflandırma Kriterlerine göre [190] granülomatöz polianjitis tanısı almış olmak
- 2006 Revize Sapporo (Sidney) Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterlerine göre [214] primer antifosfolipid sendromu tanısı almak, radyolojik veya histopatolojik gösterilmiş vasküler tromboza sahip olmak
- Etiyolojisi tam olarak ortaya konulamamış, herhangi bir hastalıkla ilişkisi gösterilememiş radyolojik veya histopatolojik olarak gösterilmiş, vasküler tromboza sahip olmak
- 18 yaş ve üzerinde olmak
- Çalışma öncesinde steroid dahil immünsupresif bir tedavi ajanı ve herhangi bir antikoagülan tedavi almamak

Hastaların çalışmadan dışlanma kriterleri:

- 18 yaş altında olmak
- Hastaların çalışmaya katılmak istememesi
- Çalışma öncesinde kortikosteroidler dahil immünnosüpresif veya antikoagülan tedavi almış olmak

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır (Tarih ve sayı: 28.04.2023-1744191). Çalışmaya 01.01.2025–30.01.2026 tarihleri arasında hasta alımı yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmıştır.

3.2. Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya yeni tanı almış ve tedavi naif vasküler trombotik Behçet hastaları ile hastalıklı kontrol grubu olarak seçilen yeni tanı almış ve tedavi naif vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu, granülomatöz polianjitis ve romatolojik hastalık ile ilişkisi gösterilmemiş derin ven trombozu tanılı olgular dahil edildi. Tüm katılımcılardan alınan periferik venöz kan örnekleri, heparinli tüplere ve %3,2 sodyum sitratlı vakumlu tüplere toplandı.

Ayrıca serum örneklerinde hücre dışı çift sarmallı DNA (cf-dsDNA) düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla her katılımcıdan özel tüplere (IVD Cell-Free DNA Collection Tube) (Roche, Basel, Switzerland) ek periferik venöz kan örneği

alınmıştır. Serum elde edilmesi amacıyla 5 mL kırmızı kapaklı kuru tüplere alınan periferik kan örnekleri 2500 g'de 12 dakika santrifüj edildi ve ayrılan serum örnekleri ELISA analiz aşamasına kadar −80°C'de saklandı. Lupus antikoagülanı (LA) varlığı, İstanbul Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi ile İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarlarında, ISTH kılavuzu doğrultusunda aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) temelli testler kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1. Periferik Kandan Nötrofil İzolasyonu

Deney gruplarından periferik kan heparinli vakumlu tüplere (Vacusera, Türkiye) toplanarak ve taze kan Polymorphprep™ (Serumwerk, Germany) üzerine katman oluşturacak şekilde yayılarak 450 g'de 40 dakika 18-22ºC'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası düşük dansiteli nötrofiller periferik kan mononükleer hücre katmanından, normal dansiteli nötrofiller nötrofil katmanından izole edilmiş ve RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ile 450 g'de bir kez yıkandıktan sonra tripan mavisi (Sigma, St. Louis, MO, USA) yöntemi kullanılarak canlılık oranları değerlendirilmiştir. Kültür aşamasına kadar hücreler; %10 fetal dana serumu, 1 mM sodyum pirüvat, %1 MEM non-esansiyel aminoasit ve vitamin solüsyonu, 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 50 µM 2-merkaptoetanol içeren RPMI-1640 kültür medyumunda (tamamı Sigma, St. Louis, MO, USA) bekletilmiştir. Nötrofillerin saflığı Novocyte akan hücre ölçer cihazında (Acea Biosciences, USA) anti-human CD16-PE ve anti-human CD15- APCCy7 (ikisi de BioLegend, San Diego, CA, USA) monoklonal antikorları kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2. Düşük Dansiteli Nötrofil İzolasyonu

Yoğunluk santrifüjü sonrası düşük dansiteli hücre katmanında nötrofil dışında lenfosit ve monosit kontaminasyonu olacağından ve nötrofil kültürlerinde saflık oranının yüksek olması gerektiğinden manyetik olarak nötrofil izolasyon kiti kullanılarak yüksek saflıkta nötrofil izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla Mojosort nötrofil izolasyon kiti (BioLegend, San Diego, CA, USA) kullanıldı. Periferik kan mononükleer hücre katmanından izole edilen hücreler 1 ml Mojosort tampon çözeltisinde (BioLegend, San Diego, CA, USA) dilüe edildi ve hücre sayısına göre biyotin konjuge antikor kokteyli (BioLegend, San Diego, CA, USA) ile 15 dakika buzda inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası hücre süspansiyonuna hücre sayısına göre streptavidin nanopartiküller eklenip 15 dakika buzda inkübe edilip inkübasyon sonrası Mojosort tampon çözeltisi ile 450 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 2 ml Mojosort tampon ilave edilerek Mojosort magnet yardımıyla negatif seleksiyon ile nötrofiller izole edilip 450 g'de PBS ile santrifüj edildikten sonra hücre sayısı ve saflık oranları tespit edildi. Düşük dansiteli nötrofiller kültür aşamalarında kadar RPMI-1640 kültür medyumunda bekletilmiştir. Nötrofil deneylerinde kullanılan monoklonal antikorlar, deney malzemeleri ve laboratuvar cihazları Tablo 2 ve Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 2. Kullanılan monoklonal antikorlar ve deney malzemeleri

Kullanılan Monoklonal Antikorlar	Üretici Bilgisi
anti human CD15-APCCy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti human CD16-PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-CD45–Brilliant Violet 510™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti human CD49d-BrillantViolet 570™	BioLegend, San Diego, CA, USA
Brilliant Violet 421™ Donkey Anti Rabbit IgG	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti human MPO-FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
sitrulinlenmiş histon H3	Abcam, Cambridge, UK
Anneksin V-FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Propidyum iyodid (PI)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Kullanılan diğer deneysel malzemeler	
Etilendiamin tetraasetik asit(EDTA) tüpleri	Vacusera, Türkiye
Polymorphprep™	Serumwerk, Germany
Fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi	Sigma, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehit %4'lük solüsyon	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Forbol miristat asetat (PMA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Pneumovax 23 (PSV-23) aşı	MSD, USA
Fetal dana (bovine) serumu	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bovine serum albümin (BSA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI-1640 glutaminli besiyeri	Sigma, St. Louis, MO, USA
MEM (Minimal essential medyum) non esansiyel aminoasit	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Hypaque solusyonu	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tripan mavisi	Sigma, St. Louis, MO, USA
Helix NP™ NIR	BioLegend, San Diego, CA, USA
CYTO-FAST Fix/Perm Buffer Set	BioLegend, San Diego, CA, USA
Mojosort human nötrofil izolasyon kiti	BioLegend, San Diego, CA, USA
Mojosort tampon çözelti	BioLegend, San Diego, CA, USA
Mojosort magnet	BioLegend, San Diego, CA, USA
ROS ölçüm kiti (DCFDA Cellular ROS	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

Detection Assay)	
Human MPO ELISA kit	Sunlong Biotech Co LTD, China
Human sitrülinlenmiş histon H3 ELISA kit	Sunlong Biotech Co LTD, China
Human PAD4 ELISA kit	Sunlong Biotech Co LTD, China
Human NE (Nötrofil elastaz) ELISA kit	Sunlong Biotech Co LTD, China
Quant-iT PicoGreen dsDNA ölçüm kiti	Thermo Fisher Scientific, USA
Quant-IT™ PicoGreen™ dsDNA reaktifi	Thermo Fisher Scientific, USA
Cell-Free DNA toplama tüpleri	Roche, Basel, Switzerland

Tablo 3. Nötrofil deneylerinde kullanılan laboratuvar cihazları

Cihaz	**Üretici firma bilgisi**
NovoCyte akan hücre ölçer	Acea Biosciences, USA
FACSAria II	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
MojoSort™ manyetik ayırma cihazı	BioLegend, San Diego, CA, USA
Lazer taramalı Konfokal mikroskop	Leica TCS-SPE
Etüv	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Nüve LN 120 Laminar kabin	Nüve, Ankara, Türkiye
MidiMACS™ separatör	Miltenyi Biotec, Almanya
NF1200R Santrifüj cihazı	Nüve, Ankara, Türkiye
Nüve NF1000R Santrifüj cihazı	Nüve, Ankara, Türkiye
+4 ºC Buzdolabı	Arçelik, İstanbul, Türkiye
-20 ºC Buzdolabı	Arçelik, İstanbul, Türkiye
Bio Vortex V1 Vorteks cihazı	Biosan, Kocaeli, Türkiye
Micro Pipet seti	Gilson-Pipetman, Middleton, WI, USA



Şekil 3. Düşük dansiteli nötrofillerin izolasyonunda kullanılan MojoSort™ manyetik ayırma cihazı (BioLegend).

3.2.3. Nötrofillerin Kültür Aşamaları için Doz Belirleme Deneyleri

Polymorphprep™ (Serumwerk, Germany) ile nötrofil izolasyonu sonrası izole edilen normal dansiteli nötrofiller RPMI-1640 kültür medyumuna (Sigma, St. Louis, MO, USA) transfer edilerek hücre sayımları yapılmıştır. Kültür deneylerinde nötrofiller için besiyeri olarak RPMI-1640 medyumu kullanılmıştır. PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) ve pnömokok antijeni [23-valanlı polisakkarid pnömokok aşısı (PSV-23)] (MSD, USA) için uygun uyarım dozlarının belirlenmesi amacıyla, 24 kuyucuklu kültür plaklarında her kuyucukta 2 x 10^5 hücre olacak şekilde nötrofiller; PMA'nın 10 nM, 25 nM, 50 nM ve 100 nM konsantrasyonlarında ve PSV-23 pnömokok aşı antijeninin 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml konsantrasyonlarında 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası nötrofillerin canlılığını test etmek amacıyla nötrofiller Helix NP™ NIR boyası (BioLegend, San Diego, CA, USA) ile inkübe edilmiş ve sonrasında akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Eş zamanlı olarak stimülasyonsuz koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda PMA ile PSV-23 antijenik uyarımı sonrası nötrofillerde reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretimi ile yüzey sitrülinlenmiş histon H3 (sitH3) ve miyeloperoksidaz (MPO) ekspresyon oranları akan hücre ölçer yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3.2.4. In Vitro Kültür Aşamaları

Kültür aşamalarında kullanılacak PMA ve PSV-23 pnömokok antijeni dozları belirlenmiştir. Periferik kandan izole edilen nötrofiller her kuyucukta 2 x 10^6 /ml hücre süspansiyonu olacak şekilde ayarlanmış ve sonrasında uyaransız koşullarda, 10 nM PMA ve 100 ng/ml pnömokok antijeni (23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı-PSV-23) varlığında 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası kültür üst sıvıları sitrolinlenmiş histon H3 (sitH3), miyeloperoksidaz (MPO), nötrofil elastaz (NE) ve peptidil arjinin deiminaz-4 (PAD4) bakılması amacıyla ELISA tayinine kadar -80ºC'de dondurulmuştur. Deneylerimizde ayrıca kültür üst sıvıları hücre dışı çift sarmallı DNA (cf-dsDNA) konsantrasyonunun spektrofotometrede ölçülmesi amacıyla -80ºC'de saklanmıştır.

3.3. Nötrofil Reaktif Oksijen Ürünlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Analizi

Hasta ve hastalıklı kontrol gruplarından izole edilen normal ve düşük dansiteli nötrofillerde, uyarımsız ve PMA, PSV-23 pnömokok antijeni ile uyarılmış koşullarda 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda 4 saatlik kültür sonrası reaktif oksijen ürünleri (ROS) düzeylerinin belirlenmesi amacıyla total ROS ölçüm kiti kullanılmıştır.

2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) probu (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) dimetil sülfoksit (DMSO) ile uygun konsantrasyonda dilüe edilmiş ve -20ºC'de muhafaza edilmiştir. İnkübasyon sonrası normal ve düşük dansiteli nötrofiller anti-human CD16-PE, anti- human CD15-APCCy7, anti-human CD45 BrillantViolet 510™, anti-human CD49d-BrillantViolet 570™ monoklonal antikorları (tümü BioLegend, San Diego, CA, USA) ile karanlıkta oda ısısında 20 dakika boyanmıştır. İnkübasyon sonrası yıkama aşamasını takiben nötrofil süspansiyonları 1 ml serum içermeyen RPMI-1640 medyumu ve DCFH-DA probu ile 30 dakika 37ºC'lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler NovocyteACEA akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Veri analizi FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) programları ile yapılmıştır

3.4. NETosis Belirteçlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Analizi

Pnömokok antijeni (23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı-PSV-23) ve PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofil alt grupları membran geçirgenliği olmayan DNA'ya bağlanan Helix NP™ NIR canlılık boyası, nötrofil yüzey belirteçleri ve NETosis belirteçleri ile boyanmıştır. Bu amaçla her tüpe stimülasyonsuz, PMA ve pnömokok antijeni (23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı-PSV-23) ile stimüle edilmiş nötrofil süspansiyonu pipetlenmiş ve anti-human CD16-PE, anti-human CD15-APCCy7, anti-human CD45-BrillantViolet 510™, anti-human CD49d-BrillantViolet 570™, anti-human MPO-FITC, anti-sitrulinlenmiş histon H3 primer antikoru (tümü BioLegend, San Diego, CA, USA) ile 20 dakika karanlıkta, oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBS ile bir kez 300xg devirde 5 dakika santrifüj aşamasını takiben hücreler Helix NP™ NIR ve donkey anti-rabbit IgG-BrillantViolet 421™ (ikisi de BioLegend, San Diego, CA, USA) ile 15 dakika karanlıkta oda ısısında boyanmıştır. Nonspesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla her bir örnek için boyasız tüp hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası PBS ile bir kez 300xg devirde 5 dakika santrifüj aşamasını takiben %2'lik paraformaldehitli PBS ilave edilmiş ve hücreler akan hücre

ölçer cihazında (NovocyteACEA) analiz edilmiştir. FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) program ile veri analizleri tamamlanmıştır.

3.5. Nötrofil Alt Gruplarında Apoptozis Oranlarının Akan Hücre Ölçer ile Analizi

Erken apoptotik evrede hücre membranının asimetrisi kaybolmakta ve membran fosfolipidi olan fosfatidilserin plazma membranının dışına lokalize olmaktadır. Fosfatidilserin oranı ve ölü hücre oranlarının belirlenmesi amacıyla akan hücre ölçer yöntemiyle FITC Anneksin V Apoptosis Deteksiyon Kit I (apoptoz belirleme kiti) (BioLegend, San Diego, CA, USA) kullanılmıştır. Bu amaçla 4 saatlik kültür aşamaları sonrası toplanan normal ve düşük dansiteli nötrofil alt grupları bağlanma tamponu ilave edilmiş tüplerde anti-human CD16-PE, anti-human CD15-APCCy7, anti-human CD45 BrillantViolet 510™, anti-human CD49d-BrillantViolet 570™, Anneksin V-FITC ve ortamdaki ölü nötrofillerin belirlenebilmesi amacıyla propidyum iyodid (PI) (BioLegend, San Diego, CA, USA) varlığında 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiş ve santrifüj aşamalarının ardından bağlanma tamponu eklenerek NovocyteACEA akan hücre ölçer cihazında analizleri yapılmıştır. Annexin V ve PI ile boyanmayan hücreler canlı, Annexin V ile boyananlar apoptotik hücre oranlarını, sadece PI ile boyanan hücreler apoptozun son aşamalarında nekroza giden nötrofilleri temsil etmektedir. Apoptotik hücre oranları FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.6. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzakların Fluoresan Görüntü Analizi

RPMI-1640 medyumunda süspanse edilen nötrofiller kuyucuk başına 2 x 10^5 hücre/ml hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiştir. Uyarımsız, PMA ve pnömokok antijeni ile 4 saat 37ºC'de inkübasyon sonrası RPMI-1640 medyumu uzaklaştırılmış ve toplanan hücreler PBS ile 450 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşaması sonrası hücreler fiksasyon ve permeabilizasyon solüsyonu paroformaldehit solüsyonu ile 15 dk +4ºC'de inkübe edilmiştir. Hücreler saponun içeren solüsyon ile 450 g'de santrifüj edilmiş ardından antikorun nonspesifik bağlanmasını önlemek için %3 BSA içeren PBS solüsyonu ile 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Bloklama sonrası hücreler 5 mg/ml Alexa Fluor® 488 Anti-Myeloperoxidase antikoru (Abcam, Cambridge, UK) ile 60 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Bağlanmayan antikorlar PBS ile santrifüj aşaması ile uzaklaştırılmıştır. Boyama sonrası hücreler lamlara aktarılmış ve ardından lamlar ProLong™ Diamond Antifade

Mountant with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solüsyonu ile karıştırılmış ve NET oluşumu Lazer taramalı konfokal mikroskopu ile gözlemlenmiştir.

3.7. Sitrolinlenmiş Histon H3, Miyeloperoksidaz, Nötrofil Elastaz ve Peptidil Arjinin Deiminaz-4 Düzeylerinin Tayini

Hasta ve hastalıklı kontrol gruplarından izole edilen serum örnekleri ile nötrofillerin stimülasyonsuz, PMA ve pnömokok antijeni (23 valan polisakkarid pnömokok aşısı-PSV-23) ile stimüle edilmiş kültür üst sıvı örnekleri ELISA tayinine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. ELISA kiti olarak insan sitrolinlenmiş histon H3 (sitH3), miyeloperoksidaz (MPO), nötrofil elastaz (NE) ve peptidil arjinin deiminaz-4 (PAD4) ELISA kitleri kullanılmıştır. Çalışma gruplarından izole edilen serum ve hücre kültür üst sıvıları ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla kitteki tüm reaktifler ve örnekler oda ısısına getirilmiştir. Her bir kitin kullanım protokolüne göre standart çözeltiler hazırlanmıştır. ELISA plak kuyucuklarına serum, kültür üst sıvısı örnekleri ve standartlar pipetlenerek plaklar 30 dakika 37ºC'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 5 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamasının ardından her bir kuyucuğa 50 µl HRP-konjugat reaktifi pipetlenmiş ve tekrar plaklar 30 dakika 37 ºC'de inkübe edilmiştir. Yıkama tamponu ile plakların 5 kez ELX50 cihazında yıkanmasını takiben kuyucuklara 50 µl Kromojen A ve 50 µl Kromojen B solusyonu pipetlenip 15 dakika 37ºC'de etüvde bekletilmiştir. Plaklara 50 µl/kuyu oranında stop solüsyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur. Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. Sitrolinlenmiş histon H3 ELISA kitinin sensitivitesi 1 pg/ml, nötrofil elastazın 22 pg/ml, PAD4'ün 0.1U/L ve miyeloperoksidaz kitinin ise 0.05ng/ml'dir.

3.8. Hücresiz çift zincirli DNA Miktarının Serum ve Kültür Üst Sıvılarında Analizi

Hasta ve hastalıklı kontrol gruplarından izole edilen plazma örnekleri ile uyarımsız, PMA ve pnömokok antijen uyarımlı kültür üst sıvısı örneklerinde Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ile hücre dışı çift sarmallı DNA (cf-dsDNA) miktarı kit protokolü uygulanarak florometrik yöntem ile ölçülmüştür. Bu amaçla çalışmaya dahil edilen hastalardan izole edilen IVD Cell-Free

DNA toplama tüplerine alınan serum örnekleri ve kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Kit çalışılmasına kadar örnekler toplanarak -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Bu amaçla standart eğrisinin oluşturulması için 2 µg/mL'lik bir dsDNA stok çözeltisi TE buffer içerisinde dilüe edilmiş, DNA standart eğri için konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Koyu renkli 96 kuyucuklu plaklara örnekler ve farklı konsantrasyonda standart DNA pipetlenmiş ve Quant-IT™ PicoGreen™ dsDNA reaktifi (1x) (Thermo Fisher Scientific, USA) eklenmiştir. Beş dakika oda ısısı ve karanlık ortamda inkübasyon sonrası örnekler 480 nm eksitasyon ve 520 nm fluoresan emisyonunda fluorometre cihazında ölçülmüştür. Oluşturulan standart eğriye göre her bir örneğin cf-dsDNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı (Version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli değişkenler dağılım özelliklerine bağlı olarak medyan (minimum–maksimum) olarak, kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde (%) şeklinde sunuldu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov–Smirnov testi ile değerlendirildi. Çalışmada Behçet hastalığı (BH), granülomatöz polianjitis (GPA), primer antifosfolipid sendromu (APS) ve idiyopatik vasküler tromboz (VT) olmak üzere dört hasta grubu karşılaştırıldı. Tüm hastalardan izole edilen normal dansiteli ve düşük dansiteli nötrofillerde uyarımsız, PMA ile uyarım sonrası ve PSV-23 ile uyarım sonrası ölçümler yapıldı. Aynı hasta grubunda ve aynı nötrofil alt grubunda üç farklı koşulun karşılaştırılmasında Friedman testi kullanıldı. Anlamlı fark saptanması durumunda ikili karşılaştırmalar Wilcoxon işaretli sıra testi ile gerçekleştirildi ve çoklu karşılaştırmalar için Holm düzeltmesi uygulandı. Hasta grupları arasındaki karşılaştırmalarda iki bağımsız grup için Mann–Whitney U testi, üç veya daha fazla grup için Kruskal–Wallis testi kullanıldı; anlamlılık saptandığında gruplar arası ikili karşılaştırmalar Dunn post-hoc testi ile yapıldı. Aynı hastaya ait normal ve düşük dansiteli nötrofiller arasındaki farkların değerlendirilmesinde Wilcoxon işaretli sıra testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiler, dağılım özellikleri göz önünde bulundurularak Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel testler iki yönlü olarak gerçekleştirildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafikler, her bir veri noktasının tek bir hastayı temsil ettiği ham veriler kullanılarak GraphPad Prism 10.4.1 yazılımı (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ile oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Gruplarının Demografik Özellikleri

Çalışmaya alınan hastaların hepsi tedavi naif, yeni hastalık tanısı konulmuş hastalardan oluşmaktadır. Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterlerine (ICBD 2014) göre tanı konulmuş, vasküler trombozu tespit edilen Behçet hastaları (n=8), 2006 Revize Sapporo (Sidney) Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterlerine göre primer antifosfolipid sendromu tanısı olup vasküler trombozu saptanan hastalar (n=8), vaskülit kontrol grubu olarak ACR/EULAR 2022 Granülomatöz Polianjitis Sınıflandırma Kriterlerine göre granülomatöz polianjitis tanısı olan hastalar (n=8) ve son olarak etiyolojisi tam olarak ortaya konulamamış, herhangi bir romatolojik hastalıkla ilişkisi gösterilememiş Vasküler Trombozu olan hastalar (n=8) dahil edilmiştir.

Hastaların demografik özellikleri, kardiyovasküler risk faktörleri (hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanımı, obezite, diyabetes mellitus, ailede kardiyovasküler hastalık öyküsü), klinik ve laboratuvar verileri (çalışmaya alındıkları sırada bakılan tam kan sayımı, C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı gibi akut faz reaktanları, böbrek fonksiyon testleri poliklinik vizitleri sırasında edinilen bilgilerden ve poliklinik takip dosyalarına ait verilerden elde edilerek Tablo 4'te sunulmuştur. Antifosfolipid antikorları (biyokimya laboratuvarında ELISA yöntemi ile ölçülen anti-kardiyolipin IgM ve IgG, anti-β2 glikoprotein-I IgM ve IgG antikorları ile ISTH kılavuzuna göre aPTT ölçüm testleri ile berlilenen lupus antikogülanı) ile biyokimya laboratuvarında ELISA yöntemiyle ölçülen anti-PR3 ANCA ve anti-MPO ANCA otoantikorlarına ilişkin bilgiler ilgili hastalık gruplarının özellikleri kapsamında metin içerisinde sunulmuştur.

Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarının demografik ve laboratuvar özellikleri

	Tüm hastalar (n = 32)	BH (n = 8)	GPA (n = 8)	APS (n=8)	VT (n=8)
Hastaların demografik özellikleri					
Yaş (yıl), ort±SS	42,3±15,1	41±10,6	37,0±19,8	48,7±9,4	42,4±18
Cinsiyet, n (%)					
Kadın	13 (41)	2 (25)	2 (25)	5 (62,5)	4 (50)
Erkek	19 (59)	6 (75)	6 (75)	3 (37,5)	4 (50)
BMI (kg/m^2), ort±SS	24,6±2,3	24,5±1,9	23,9±0,9	25,6±4,0	24,2±0,9
Fazla kilolu (BMI 25-29.9), n (%)	12 (37.5)	2 (25)	2 (25)	6 (75)	2 (25)
Obezite (BMI≥ 30), n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sigara kullanımı, n (%)	33 (43,8)	4 (50)	4 (50)	4 (50)	2 (25)
Alkol kullanımı, n (%)	3 (9,4)	1 (12,5)	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)
Komorbiditeler, n (%)					
Diyabetes mellitus	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
Hipertansiyon	3 (9,4)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	2 (25)
Hiperlipidemi		0 (0)	0 (0)	4 (50)	4 (50)
İskemik kalp hastalığı	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)
Ailede vasküler tromboz öyküsü	6 (18,8)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)
Laboratuvar parametreleri					
C-reaktif protein (mg/l), ort±SS	53,9±70,3	54,3±36,4	137±86	7,6±6,5	16,2±32
Eritrosit sedimentasyon hızı (mm/sa), ort±SS	34,8±28,8	37,7± 33,3	63,8±20,3	25,7±19,1	11,7±10,7
Total lökosit sayısı ($10^3/\mu l$), ort±SS	9,7±4,7	8,7± 2,1	15,9±5,4	7,7±1,9	6,6±1,6
Mutlak nötrofil sayısı ($10^3/\mu l$), ort±SS	7,1±4,7	6,1±2,1	13,3±5,2	4,9±1,6	4,1±1,3
Hemoglobin, (g/dl), ort±SS	12,5±1,9	13,1±2,2	11,0±1,8	13,0±1,1	12,8±2
Trombosit sayısı ($10^3/\mu l$), ort±SS	313±120	306±126	437±129	233±58	277±40
Kreatinin (mg/dl), ort±SS	1,2±1,3	0,8±0,1	2,4±2,2	0,8±0,1	0,7±0,2
Laktat dehidrogenaz (LDH) (U/l), ort±SS	219±94	196±34	291±106	187±104	200±87
LDL kolesterol (mg/dl), ort±SS	106±30	104±25	85±28	116±27	119±33
Trigliserid (mg/dl), ort±SS	125±59	111±30	96±27	160±64	130,5±84
PT (sn), ort±SS	13,2±3,8	15,1±6,9	11,9±1,3	13,2±2,4	12,4±0,9
aPTT (sn), ort±SS	29,3±5,4	30,7±5,6	27,6±5,9	28,9±6,2	29,7±4,1

(Açıklamalar: **BH:** vasküler trombozu olan Behçet Hastalığı, **GPA:** Granülomatöz Polianjitis, **APS:** vasküler trombozu olan Primer Antifosfolipid Sendromu, **VT:** idiyopatik Vasküler Tromboz, **BMI**: beden kitle indeksi, **PT**: protrombin zamanı, **aPTT**: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, **n:** hasta sayısı, **ort±SS:** ortalama ± standart sapma)

Çalışmada yer alan vasküler trombozu olan Behçet hastalarının (n=8) klinik özellikleri Tablo 5'te sunulmuştur. Hastaların tümünün tekrarlayan oral aftöz ülserleri mevcut olup, bunların 5'inde eşlik eden skar bırakan genital ülser öyküsü mevcuttu. Hastaların 3'ünde muayene ile gösterilmiş Behçet ilişkili üveit öyküsü, 3 hastada Behçet ile ilişkili deri lezyonları (eritema nodozum, psödofolikülit ve papülopüstüler lezyonlar) mevcuttu. Hastaların tümünün Paterji deri testi değişen şiddetlerde pozitiflik gösterdi. Behçet hastalarının tümünde derin ven trombozu ve iki hastada ayrıca eşlik eden pulmoner arter dallarında tromboz mevcuttu. HLA-B51 pozitifliği hastaların 5'inde mevcuttu. Çalışmaya dahil edilen Behçet hastalarının hiçbirinde nörolojik tutulum yoktu.

Tablo 5. Uluslararası Behçet Hastalığı Kriterlerine (ICBD 2014) göre Behçet hastalarının klinik özellikleri (n=8) [23]

Kriterler, n (%)	
Oral aftlar (rekürren) (2 puan)	8 (100)
Genital ülserler (skar bırakan) (2 puan)	5 (62,5)
Göz tutulumu (üveit, retinal vaskülit) (2 puan)	3 (37,5)
Deri lezyonları (eritema nodozum, papülo-püstüler lezyonlar, psödofolikülit) (1 puan)	3 (37,5)
Nörolojik bulgular (1 puan)	0 (0)
Vasküler bulgular (tromboz, anevrizma) (1 puan)	8 (100)

** Bu kriterlere göre toplamda 4 puan ve üzerinde alan hastalar Behçet hastalığı olarak sınıflandırılabilmektedir.

Çalışmada yer alan ANCA ilişkili vaskülit grubunu temsil eden ve 2022 ACR/EULAR sınıflandırma kriterlerine göre granülomatöz polianjitis tanılı hastaların (n=8) klinik, otoantikor, radyolojik ve histopatolojik bulguları Tablo 6'da sunulmuştur [190]. Bu hastaların yarısında nazal tutulum, yedisinde pulmoner tutulum ve altısında renal biyopsi ile kanıtlı pauci-immün glomerülonefrit tablosu mevcuttu. Granülomatöz polianjitis hastalarının hepsinde PR3-ANCA pozitif olup, PR3-ANCA titreleri medyan 188,5 U/mL (76–200) olarak tespit edildi. Granülomatöz polianjitis hastalarının hiçbirinde MPO-ANCA pozitifliği izlenmedi.

Tablo 6. 2022 ACR/EULAR sınıflandırma kriterlerine göre granülomatöz polianjitis hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri (n=8) [190]

Klinik riterler, n (%)	
Nazal tutulum (3 puan)	4 (50)
Kıkırdak tutulumu (2 puan)	3 (37,5)
İletim veya sensörinöral tip işitme kaybı (1 puan)	1 (12,5)
Laboratuvar, görüntüleme ve biyopsi kriterleri, n (%)	
cANCA veya anti proteinaz 3 (anti-PR3 antikor) pozitifliği (5 puan)	8 (100)
Pulmoner nodül, kitle veya kavitasyon (2 puan)	7 (87,5)
Biyopside granülom, ekstravasküler granülomatöz inflamasyon veya dev hücreler (2 puan)	0 (0)
Görüntülemede burun/paranazal sinüs/mastoid iltihabı, konsolidasyonu ve efüzyonu (1 puan)	4 (50)
Biyopside pauci-immün glomerülonefrit (1 puan)	6 (75)
pANCA veya miyeloperoksidaz (anti-MPO) antikor pozitifliği (-1 puan)	0 (0)
Kan eozinofil sayısı≥ $1x10^9$/litre (-4 puan)	1 (12,5)

** Bu kriterlere göre toplamda 5 ve üzerinde puan alan hastalar Granülomatöz polianjitis olarak sınıflandırılabilmektedir.

Çalışmada yer alan Revize Sapporo (Sidney) 2006 Antifosfolipid Sendromu Sınıflandırma Kriterleri'ne göre primer antifosfolipid sendromu tanısı olup vasküler trombozu olan hastaların (n=8) hepsinde persiste eden lupus antikoagülan testi pozitifliği mevcuttu [214]. Hastaların 6'sında anti beta2 glikoproteinI IgM, 2'sinde anti beta2 glikoproteinI IgG, 2'sinde anti kardiyolipin IgM ve 3'ünde anti kardiyolipin IgG antikor pozitifliği tekrarlayan ölçümlerde gösterildi. Antifosfolipid sendromu grubundaki tüm hastalarda alt ekstremite derin ven trombozu mevcut olup, üç hastada ayrıca pulmoner arter dallarında pulmoner emboli ile uyumlu dolum defektleri saptandı.

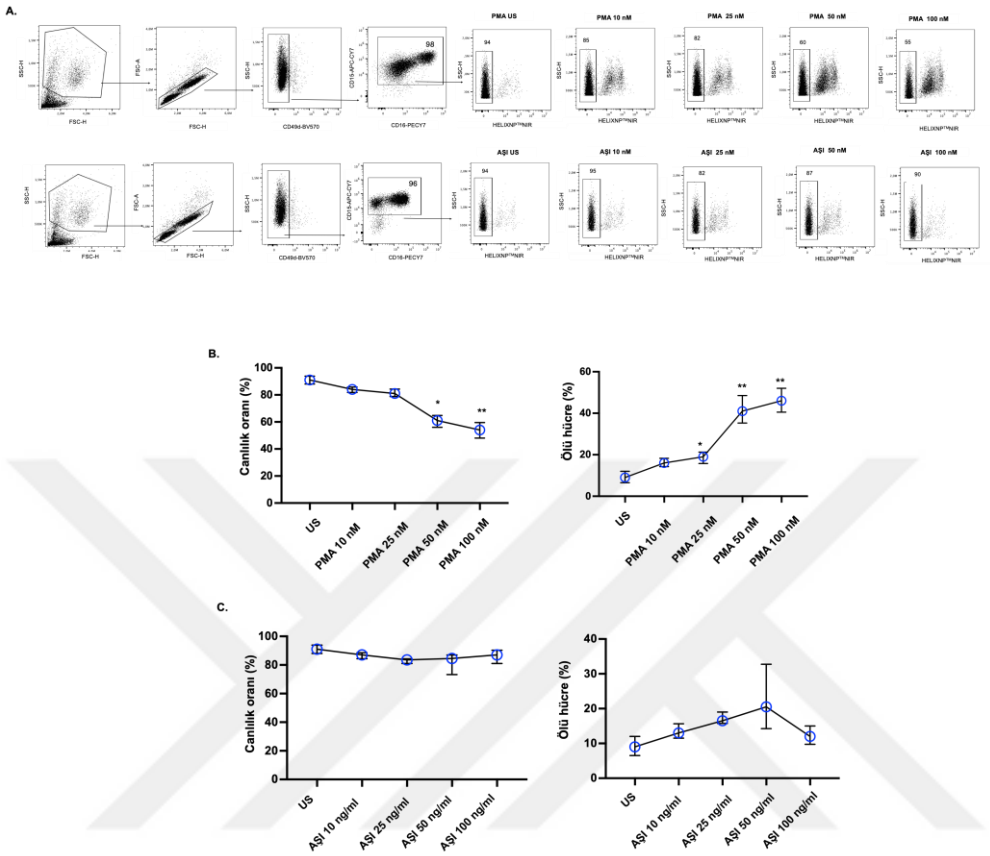
Çalışmada kontrol grubu hastaları içerisinde yer alan; etiyolojisi tam olarak ortaya konulamamış, herhangi bir romatolojik hastalıkla ilişkisi gösterilememiş vasküler tromboz hastalarının tümünde alt ekstremite venöz sistemini ilgilendiren derin ven trombozu mevcuttu.

4.2. Nötrofillerin İn Vitro Kültür Aşamaları İçin Doz Belirleme Deney Sonuçları

4.2.1. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının Nötrofil Canlılığına Etkileri

Kültür sonrası akan hücre ölçer cihazında nötrofil kapısı alınmış yapışık hücrelerin elimine edilmesinden sonra eozinofil kontaminasyonu CD49d antikoru aracılığıyla dışlanmıştır. Saf nötrofil süspansiyonunda ($CD16^+CD15^+$) Helix NP™NIR boyanmayan hücreler canlı hücre olarak kaydedilmiştir (Şekil 4A). Farklı PMA

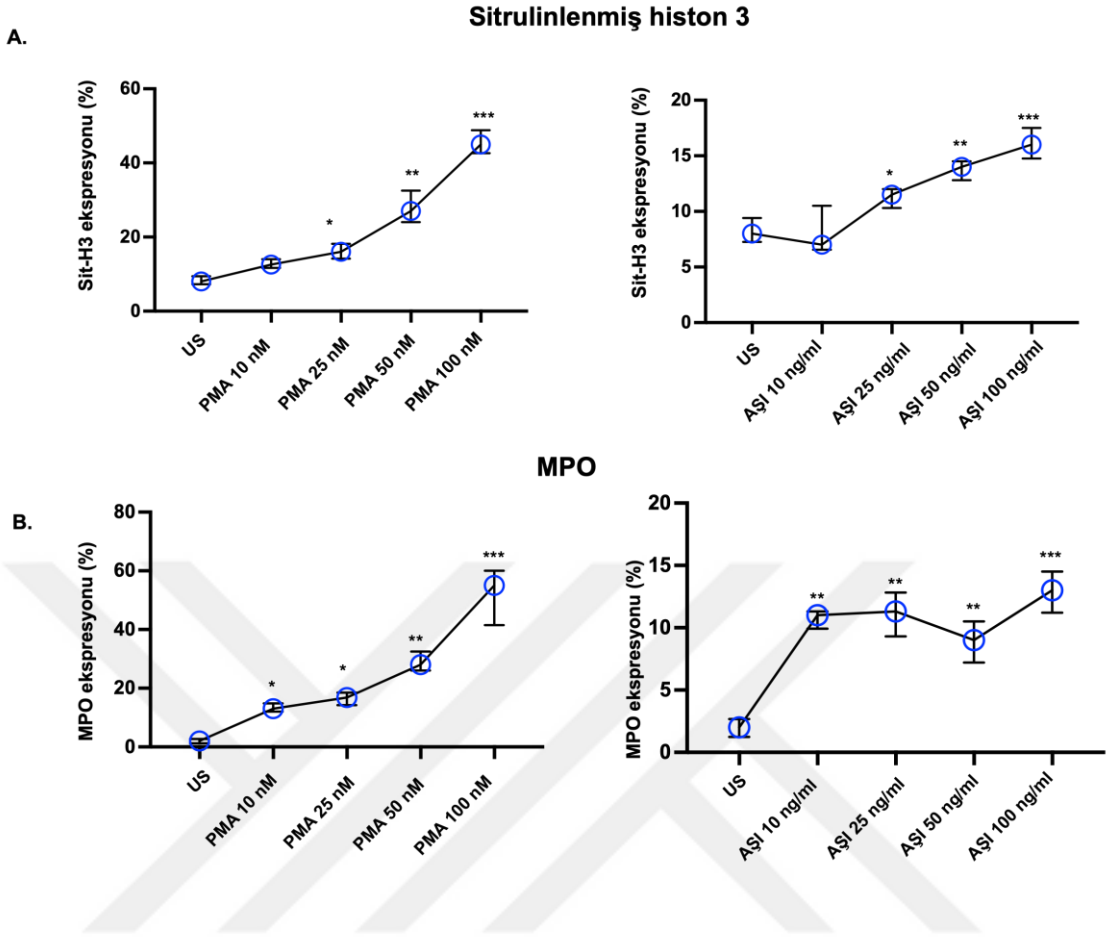
konsantrasyonunun nötrofil canlılığına etkileri incelendiğinde daha önce nötrofil uyarımlarında kullanılan doz çalışmaları laboratuvar şartlarında incelenmiştir. PMA ile yapılan doz denemesinde canlı hücre oranında stimülasyonsuz şarta göre 50 nM, ve 100 nM dozlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır ($p=0,025$ ve $p<0,001$, sırasıyla). Özellikle 50 ve 100 nM dozlarında belirgin hücre kaybı izlenmiştir. Buna parallel bir şekilde ölü nötrofil oranları stimülasyonsuz şartla kıyaslandığında 25 nM, 50 nM, ve 100 nM dozlarda anlamlı derecede artmıştır ($p=0,024$ ve $p<0,001$, sırasıyla). Akan hücre ölçer cihazında ölçülen nötrofil canlılığı ve ölü hücre oranları göz önüne alındığında optimal PMA konsantrasyon dozu 10 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 4B). PSV-23 antijenin 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml dozları incelendiğinde aşının artan dozlarında nötrofil canlılık oranlarında anlamlı farklılık saptanmadı. Ölü hücre oranlarında ise 50 ng/ml aşı dozlarında uyarımsız şarta kıyasla kısmi artış saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi. Uyarım dozu olarak deneylerimizde 100 ng/ml PSV-23 antijeni kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4C).



Şekil 4. Uyarımsız, PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının nötrofil canlılığına etkileri.
A. Nötrofillerin kapılama stratejisi ve Helix NP™NIR boyama sonuçları. B. PMA ve C. PSV-23 antijen dozlarının nötrofil canlı ve ölü hücre oranlarına etkisi (*p=0,025 ve **p<0,001)
(PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı)

4.2.2. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının NETosis Belirteçlerine Etkileri

Nötrofillerin uyarımsız koşullarda ve farklı PMA (10 nM, 25 nM, 50 nM ve 100 nM) ve PSV-23 antijen dozlarında (10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml) flow sitometri ile değerlendirilen hücre dışı sitrulinlenmiş histon 3 ve MPO ekspresyon yüzdeleri analiz edildiğinde, PMA dozu arttıkça nötrofillerin canlılık oranlarında azalmaya paralel olarak sitrulinlenmiş histon 3 ekspresyonlarında artış saptanmıştır. PSV-23 antijen dozlarının 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml dozları sit-H3 ekspresyonlarını stimülasyonsuz şarta göre arttırmıştır (p=0,032, p=0,022 ve p<0,001, sırasıyla) (Şekil 5A). Nötrofillerde diğer bir NETosis belirteci olan MPO ekspresyonları analiz edildiğinde artan PMA ve aşı dozlarında stimülasyonsuz şarta göre artış göstermiştir (Şekil 5B).

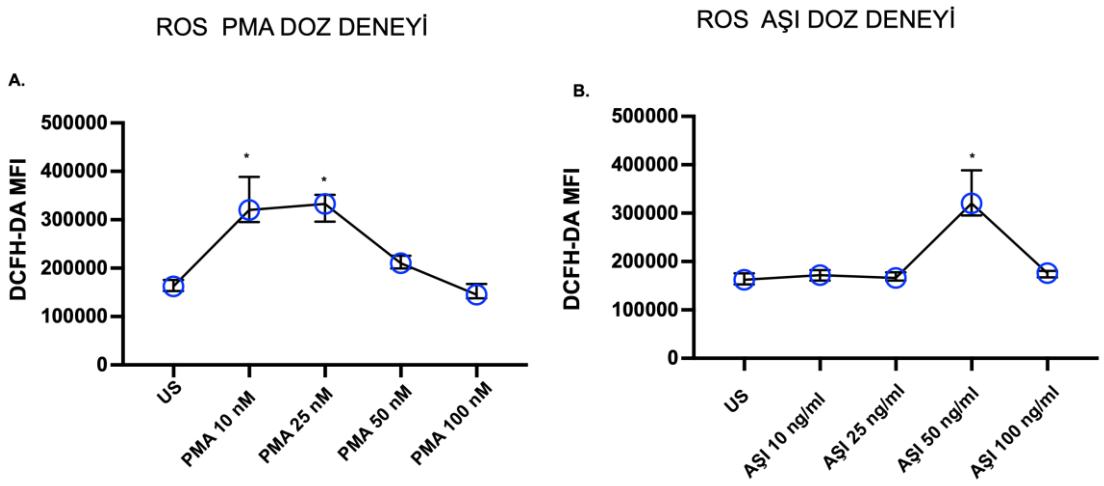


Şekil 5. Uyarımsız, PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının nötrofil NETosis ekspresyonuna etkisi.

A. Nötrofillerde hücre dışı sitrulinlenmiş histon H3 ekspresyonu B. PMA ve PSV-23 aşısı antijen dozlarının nötrofil yüzey MPO ekpresyonuna etkisi (*p=0,032, **p=0,022 ***p<0,001) (PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, MPO: miyeloperoksidaz)

4.2.3. PMA ve PSV-23 Antijen Dozlarının ROS Düzeylerine Etkileri

Nötrofillerde reaktif oksijen ürünleri (ROS) düzeylerinin kantitatif analizi, nötrofillerin fonksiyonel aktivitesinin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteçtir. Akan hücre ölçer ile yapılan ROS ölçümleri, nötrofil aktivasyon durumunu ve oksidatif stres yanıtını hassas bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu amaçla PMA ve PSV-23 antijenlerinin farklı dozlarının nötrofil fonksiyonlarına etkisi akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Uyarımsız şartlara göre PMA'nın 10 nM ve 25 nM konsantrasyonlarında ROS düzeyleri artmıştır (p= 0,012) (Şekil 6A). PSV-23 antijen uyarımının artan dozlarının ise uyarımsız şartlara göre sadece 50 ng/ml dozlarında ROS düzeylerinde artış saptanmıştır (Şekil 6B).



Şekil 6. Nötrofil fonksiyonlarına PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının etkisi.
Farklı dozlarda PMA ve PSV-23 antijenleri ile uyarılan nötrofillerde DCFH-DA probu kullanılarak akan hücre ölçer yöntemiyle değerlendirilen ROS (reaktif oksijen ürünleri) düzeylerine ait ortalama floresans şiddeti (MFI) değerleri (*p=0,012).
(PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı)

4.3. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi İle Analizi

4.3.1. Hastalık Alt Gruplarında Reaktif Oksijen Ürünlerinin Analiz Sonuçları

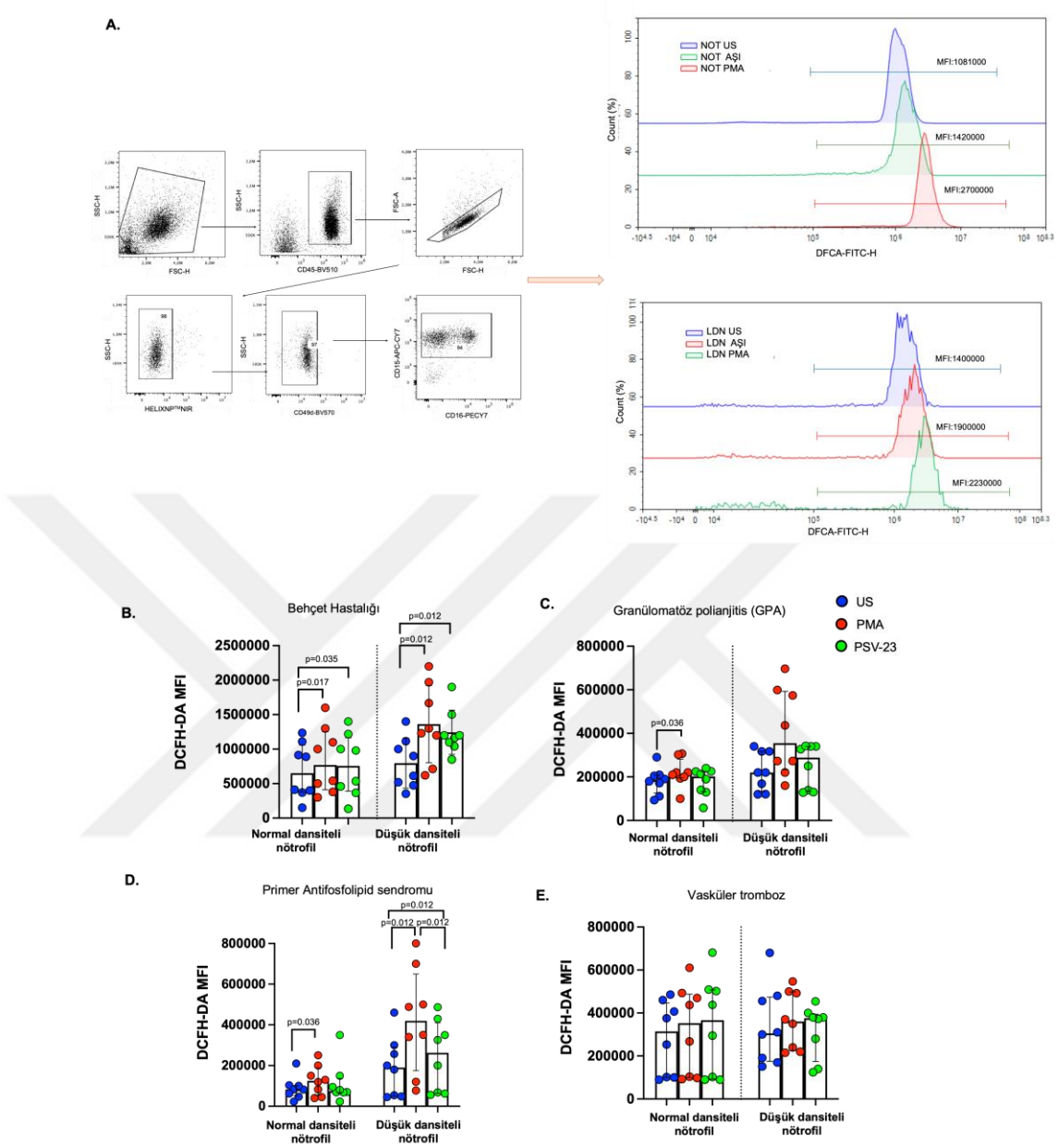
Vasküler trombozu olan Behçet hastalarında, normal dansiteli nötrofiller unstimüle koşullarda düşük düzeyde ROS üretirken, hem PMA hem de PSV-23 uyarımı sonrası anlamlı artış göstermiştir (p= 0,017 ve p= 0,035, sırasıyla). Benzer şekilde, düşük dansiteli nötrofillerde de her iki uyarı sonrası belirgin ROS yanıtı izlenmiştir (p=0,012) (Şekil 7A ve 4B). Nötrofil alt grupları karşılaştırıldığında, unstimüle koşulda fark saptanmazken, PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası düşük dansiteli nötrofillerde ROS düzeyleri normal dansiteli nötrofillere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p= 0,050 ve p= 0,017) (Şekil 7A ve 7B).

Granülomatöz polianjitis grubunda, normal dansiteli nötrofillerin ROS üretiminde PMA uyarımı sonrası stimülasyonsuz şarta göre artmış saptanmıştır (p= 0,036). Düşük dansiteli nötrofillerde unstimüle koşulda hafif artmış ROS düzeyi izlenirken, özellikle PMA uyarımı sonrası bazı hastalarda artış gözlenmiştir; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu hastalık grubunda düşük dansiteli nötrofillerin ROS yanıtı heterojen olup belirgin bir aşırı aktivite sergilememiştir (Şekil 7C).

Vasküler trombozu olan primer antifosfolipid sendromu hastalarında, normal dansiteli nötrofillerde unstimüle ROS düzeyi düşük olup, PMA uyarımı sonrası

stimülasyonsuz gruba göre anlamlı artış saptanmıştır (p=0,036). Düşük dansiteli nötrofillerde hem PMA hem de PSV-23 uyarımları bazal duruma göre belirgin ROS artışı ile ilişkili olup (her ikisi için p=0,012), PMA yanıtının PSV-23'e kıyasla daha belirgin olduğu görülmüştür (p=0,012). Ayrıca, her iki uyarı altında düşük dansiteli nötrofillerin ROS yanıtı normal dansiteli nötrofillere göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır. (Şekil 7D).

Kontrol grubu olarak değerlendirilen, romatolojik hastalığı bulunmayan ve etiyolojisi net olarak ortaya konulamamış vasküler tromboz hastalarında, düşük dansiteli nötrofillerde stimülasyonsuz şartlarda ROS düzeyi hafif artmış olmakla birlikte, PMA ve PSV-23 uyarımlarına verilen yanıt normal dansiteli nötrofillerden anlamlı düzeyde farklılık göstermemiştir (Şekil 7E).



Şekil 7. Nötrofil alt gruplarında PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının ROS üretimine etkilerinin hastalık gruplarında analizi.
A. Nötrofillerin akan hücre ölçer cihazında kapılama stratejisi ve Behçet hastasında analiz edilen düşük ve normal dansiteli nötrofillerde ROS analiz örneği **B.** Behçet hastalığı, **C.** Granülomatöz polianjitis, **D.** Primer antifosfolipid sendromu ve **E.** Vasküler tromboz hastaları normal ve düşük dansiteli nötrofil alt gruplarında ROS sonuçları
(US: stimülasyonsuz, PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, ROS: reaktif oksijen ürünleri)

Hastalık alt gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerin ROS sonuç analizlerimiz aşağıda özetlenecektir. Vasküler Behçet grubunda düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası ROS üretiminin aynı koşullarda normal dansiteli nötrofillere göre sınırda anlamlı olduğu görüldü (p=0,05). Granülomatöz polianjitis

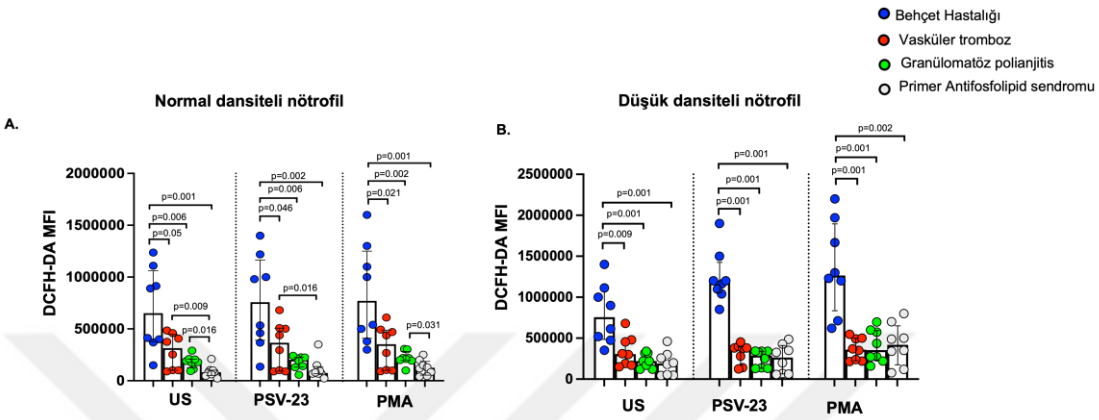
grubunda ise düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası ROS üretiminin aynı koşullarda normal dansiteli nötrofillere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (p=0,025). Vasküler tromboz ile seyreden primer antifosfolipid sendromu hastalarında, düşük dansiteli nötrofillerde, hem stimülasyonsuz koşullarda hem de PMA ve PSV-23 ile uyarım sonrası, aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillere kıyasla daha yüksek düzeyde ROS üretimi saptandı (p= 0,036, p= 0,012 ve p= 0,012, sırasıyla). Kontrol grubu olarak değerlendirilen, romatolojik hastalığı bulunmayan ve etiyolojisi net olarak ortaya konulamamış vasküler tromboz grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde aynı uyarım koşullarında ROS üretimi açısından anlamlı fark görülmedi.

4.3.2. Normal ve Düşük Dansiteli Nötrofillerde Hasta Gruplarında Reaktif Oksijen Ürünlerinin Değişimleri

Normal dansiteli nötrofillerde ROS düzeyleri açısından her üç koşulda da Behçet hastalığı grubunun ROS düzeylerinin granülomatöz polianjitis, primer antifosfolipid sendromu ve vasküler tromboz hastaları gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 8A). Ayrıca stimülasyonsuz kültür şartlarında ROS düzeyi granülomatöz polianjitis ve vasküler tromboz gruplarında primer antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla daha yüksek saptanmıştır (p=0,016 ve p=0,009, sırasıyla) (Şekil 8A). Genel olarak, normal dansiteli nötrofillerde tüm uyarım koşullarında en yüksek ROS düzeyleri Behçet hastalığı grubunda izlenirken, en düşük seviye primer antifosfolipid sendromu grubunda gözlenmiştir (Şekil 8A). PSV-23 antijen uyarımı analiz edildiğinde ROS düzeyleri Behçet hastalığı grubunda granülomatöz polianjitis, primer antifosfolipid sendromu ve vasküler tromboz hastaları gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptanmıştır ($p < 0,05$). Vasküler tromboz grubunda primer antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla PSV-23 uyarımı ROS düzeyini arttırmıştır (p=0,016). PMA uyarımı sonrası normal dansiteli nötrofillerde ROS düzeylerinin Behçet hastalığı grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, granülomatöz polianjitis grubunda ROS düzeylerinin primer antifosfolipid sendromu grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,031) (Şekil 8A).

Düşük dansiteli nötrofillerde, normal dansiteli nötrofillere benzer şekilde tüm uyarım koşullarında en yüksek ROS cevabı Behçet hastalığı grubunda saptanmıştır ($p < 0.05$). Granülomatöz polianjitis, vasküler tromboz ve primer antifosfolipid sendromu

gruplarında ROS düzeyleri daha düşük ve birbirine yakın dağılım göstermektedir. PMA ve PSV-23 uyarımları sonrasında düşük dansiteli nötrofillerde ROS düzeylerinde artış görülmekle birlikte bu artışın Behçet hastalığı dışındaki diğer gruplarda fark oluşturmadığı gözlenlenmiştir. (Şekil 8B).



Şekil 8. Tüm hasta gruplarında nötrofil alt gruplarının farklı uyaranlara ROS yanıtları
(ROS: reaktif oksijen ürünleri)

4.4. NETosis Belirteçlerinin Akan Hücre Ölçer Yöntemi İle Analizi

4.4.1. NETosis Belirteçlerinin Hastalık Alt Gruplarında Değerlendirilmesi

Behçet grubunda normal dansiteli nötrofillerde farklı uyarım koşulları arasında sitrulinlenmiş histon H3 (sitH3) ve MPO ekspresyonları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Buna karşın, $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozitif ekspresyonu unstimüle duruma kıyasla PMA uyarımı sonrası anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,018) (Şekil 9A). Düşük dansiteli nötrofillerde ise farklı uyarım koşulları arasında sitH3 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark izlenmezken, MPO ekspresyonunun stimülasyonsuz göre PMA uyarımı sonrası anlamlı olarak arttığı görülmüştür (p=0,028) (Şekil 10A). Ayrıca stimülasyonsuz şart göre PSV-23 antijen uyarımı düşük dansiteli nötrofillerde $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozititif hücre oranını arttırmıştır (p=0,043) (Şekil 9A).

Granülomatöz polianjitis grubunda normal dansiteli nötrofillerde sitrulinlenmiş histon H3 (sitH3) ekspresyonu stimülasyonsuz koşula kıyasla PSV-23 uyarımı sonrası azalmıştır (p=0,021). Buna karşın, MPO ekspresyonu açısından farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozitifliği stimülasyonsuz şarta göre hem PMA (p=0.050) hem de PSV-23 uyarımı (p=0,034) sonrasında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

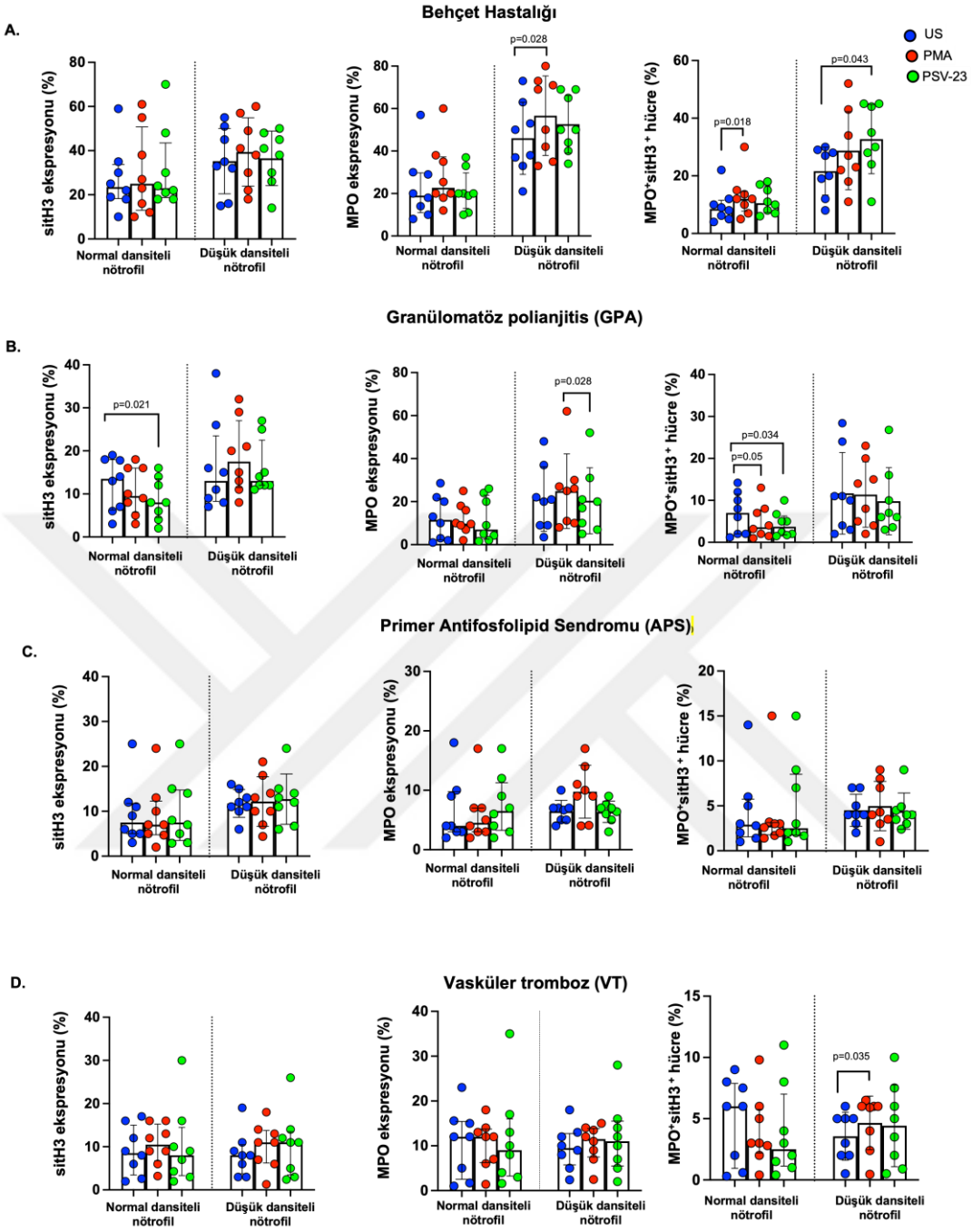
Düşük dansiteli nötrofillerde farklı uyarım şartlarında sitH3 ve $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozitifliği açısından anlamlı fark görülmezken MPO ekspresyonun PMA uyarımında PSV-23 uyarımı göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. (p= 0,028) (Şekil 9B). Granülomatöz polianjitis grubunda klasik nötrofillere kıyasla düşük dansiteli nötrofillerde bazal sitrülinlenmiş H3 ekspresyonu daha yüksek olup, yine bu grupta PMA uyarımına yanıt daha belirgindi (Şekil 10B). PSV-23 ile uyarım sonrasında NETosis belirteçlerinde artış gözlenmekle birlikte, bu artışın PMA uyarımına göre sınırlı olduğu görüldü.

Vasküler trombozu olan primer antifosfolid sendromu grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 antijen uyarımı NETosis belirteçlerinin ekspresyonları açısından anlamlı bir farklılık oluşturmadı (Şekil 9C). Çift pozitif $sitH3^{+}MPO^{+}$ eksprese eden nötrofil hücre oranları da düşük düzeylerde olup PMA stimülasyonu ile yalnızca minimal bir yükseliş gösterdi (Şekil 9C).

Romatolojik bir hastalık ile ilişkisi gösterilememiş, etiyolosi net olarak ortaya konulamamış vasküler tromboz grubunda NETosis belirteçleri değerlendirildiğinde, normal ve düşük dansiteli nötrofiller arasında genel olarak benzer bir dağılım olup belirgin bir aktivasyon yanıtı saptanmamıştır. Normal dansiteli nötrofillerde sitrulinlenmiş sitH3, MPO ve $sitH3^{+}MPO^{+}$ ekspresyonu açısından farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Düşük dansiteli nötrofillerde uyarımsız duruma göre PMA uyarımı sonrası $MPO^{+}sitH3^{+}$ ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmıştır (p= 0,035) (Şekil 9D).

Hastalık alt gruplarında farklı uyaranlar altında normal ve düşük dansiteli nötrofiller NETosis belirteçleri açısından karşılaştırılmıştır. Vasküler Behçet grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofiller akan hücre ölçer ile değerlendirilen NETosis belirteçleri açısından karşılaştırıldığında, sitrülinlenmiş histon H3 ekspresyonu yönünden anlamlı fark saptanmadı. MPO ekspresyonunun düşük dansiteli nötrofillerde, hem stimülasyonsuz koşulda hem de PMA ve PSV-23 aşı ile uyarım sonrası tüm durumlarda normal dansiteli nötrofillere kıyasla sınırda anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görüldü (p = 0,05). Ayrıca, düşük dansiteli nötrofillerin stimülasyonsuz koşullardaki MPO düzeyinin, normal dansiteli nötrofillerin PMA ile uyarılmış durumuna göre daha yüksek olduğu saptandı (p=0,035). Yine düşük dansiteli nötrofillerin PMA ile uyarımı sonrası MPO ekspresyonu, normal dansiteli nötrofillerin

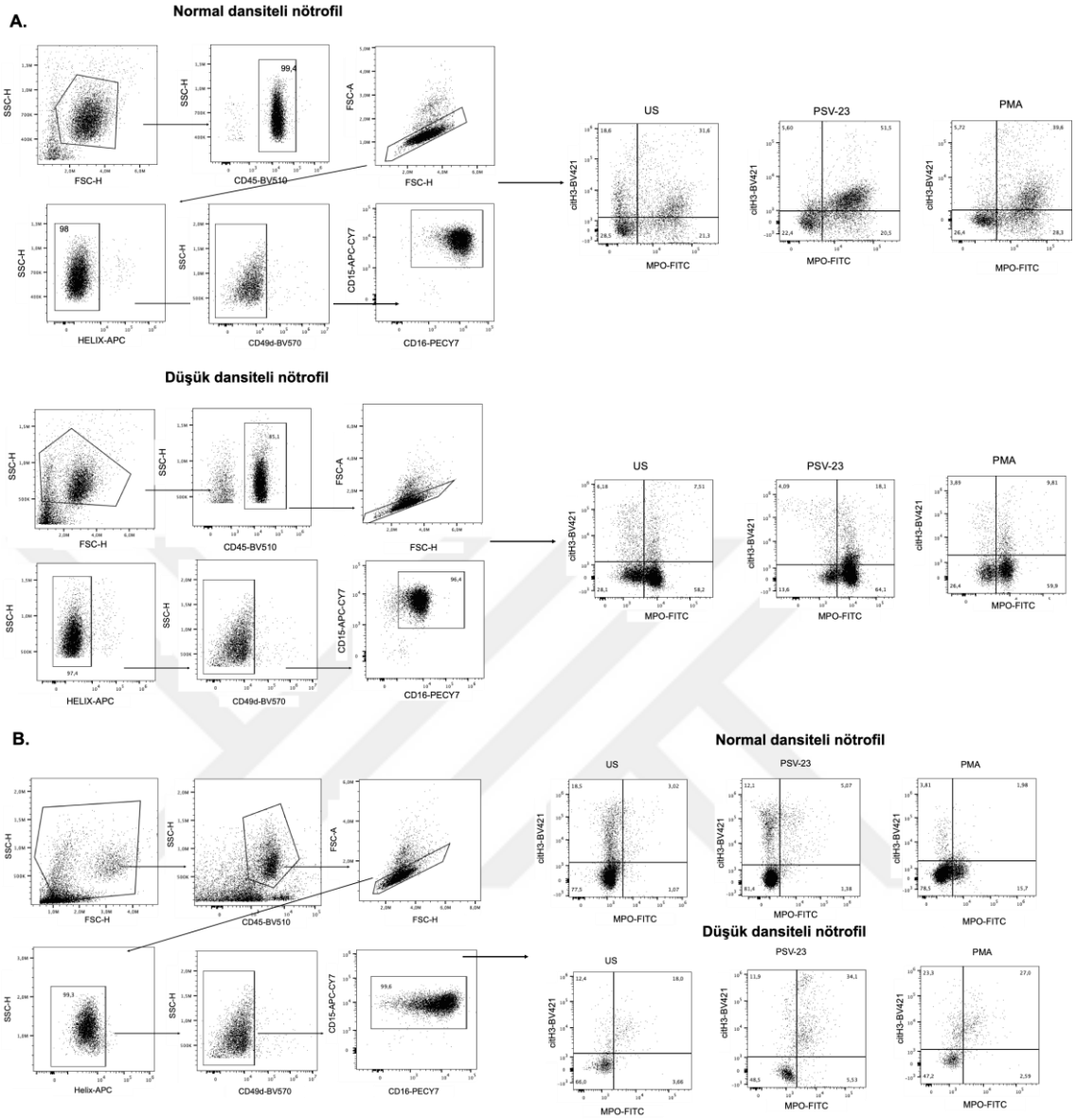
PSV-23 aşı ile uyarılmış durumuna kıyasla daha yüksek bulundu (p=0,012). $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozitifliği düşük dansiteli nötrofillerde stimülasyonsuz durumda ve PSV-23 aşı uyarımı sonrası aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden anlamlı derecede yüksek saptandı (p= 0,025 ve p= 0,017, sırasıyla). Granülomatöz polianjitis grubunda sitrülinlenmiş histon H3 ekspresyonu, PMA ve PSV-23 uyarımı sonrası düşük dansiteli nötrofillerde aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden yüksek bulunmuştur (p= 0,021 ve p= 0,017, sırasıyla). Aynı şekilde PMA ile uyarılan düşük dansiteli nötrofillerde, PSV-23 aşı ile uyarılan normal dansiteli nötrofillerden yüksek saptandı (p=0,021). MPO ekspresyonunun stimülasyonsuz ve PMA uyarımı sonrası düşük dansiteli nötrofillerde normal dansiteli nötrofillere göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptandı (p= 0,030 ve p= 0,012, sırasıyla). Benzer şekilde PMA ile uyarılan düşük danasiteli nötrofillerde MPO ekspresyonu, PSV-23 aşı ile uyarılan normal dansiteli nötrofillere göre yüksek saptandı (p= 0,012). $MPO^{+}sitH3^{+}$ çift pozitifliği düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 aşı uyarımlar sonrası aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden daha yüksekti (p= 0,012). Ayrıca, düşük dansiteli nötrofillerin unstimüle koşullardaki çift pozitiflik düzeyinin, normal dansiteli nötrofillerin PMA ile uyarılmış durumuna göre daha yüksek olduğu saptandı (p = 0,017). Vasküler trombozu olan primer antifosfolid sendromu ve vasküler tromboz grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde akan hücre ölçer yöntemiyle aynı koşullarda ölçülen NETosis parametreleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı.



Şekil 9. Hastalık alt gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteçlerinin ekspresyonları.

A. Behçet hastalığı, **B.** Granülomatöz polianjitis, **C.** Primer antifosfolid sendromu ve **D.** Vasküler tromboz hasta gruplarında NETosis belirteçleri

(sitH3: sitrülinlenmiş histon H3, MPO: miyeloperoksidaz, MPO^{+}sitH3: sitrulinlenmiş histon H3 ve miyeloperoksidaz birlikte ekspresе eden)



Şekil 10. Normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis ekspresyonları.

A. Behçet hastalığı ve **B.** Granülomatöz polianjitis hasta grubundan izole edilen nötrofil alt gruplarında akan hücre ölçer ile analiz kapılama stratejisi ve nötrofil alt gruplarında sitH3, MPO ve sitH3^{+} MPO^{+} ekspresyonlarının akan hücre ölçer analiz görüntüleri.
(sitH3: sitrülinlenmiş histon H3, MPO: miyeloperoksidaz, MPO^{+}sitH3: sitrulinlenmiş histon H3 ve miyeloperoksidaz birlikte eksprese eden)

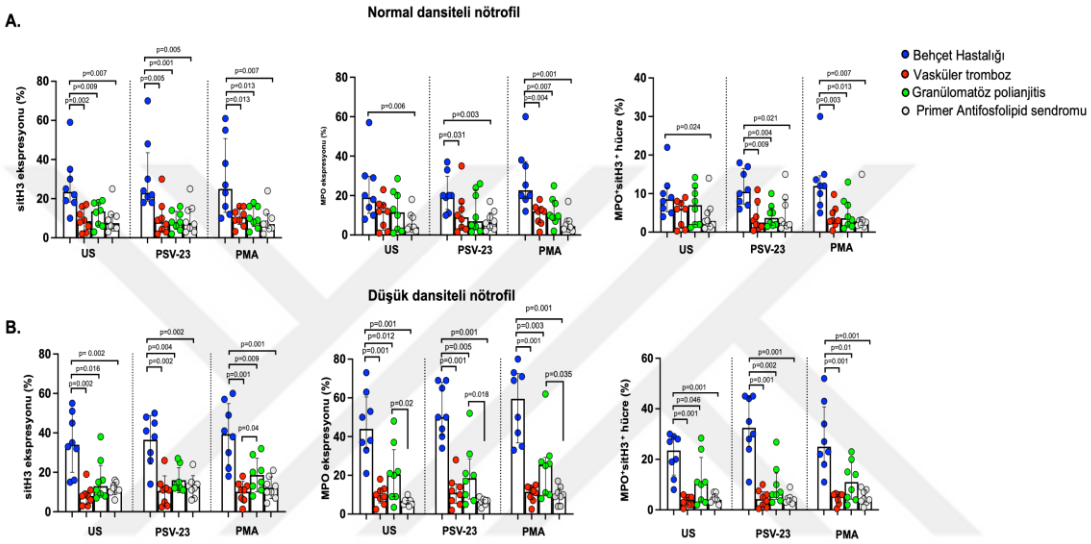
4.4.2. Tüm Hastalık Gruplarında NETosis Belirteçlerinin Değişimlerinin Kıyaslanması

Normal dansiteli nötrofillerde sitH3 ekspresyon düzeyleri dört hasta grubu arasında stimülasyonsuz ve farklı uyarım koşullarında karşılaştırılmıştır. Stimülasyonsuz koşulda sitH3 ekspresyonu, Behçet hastalığı grubunda; vasküler tromboz (p=0,002), granülomatöz polianjitis (p=0,009) ve antifosfolipid sendromu

(p=0,007) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 10A). Yine, hem PMA hem de PSV-23 uyarımları sonrası Behçet grubunun sitH3 ekspresyonunun diğer üç hasta grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (tüm $p < 0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir (Şekil 11A). MPO ekspresyonu, Behçet grubunda antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,006). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. PMA uyarımı sonrasında Behçet grubunun MPO düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,004), granülomatöz polianjitis (p=0,007) ve antifosfolipid sendromu (p=0,001) gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PSV-23 uyarımı sonrasında da benzer şekilde, Behçet grubunda MPO düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,031) ve antifosfolipid sendromu (p=0,003) gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 11A). MPO+sitH3 çift pozitiflik oranları açısından da aynı durum gözlenmiştir. Stimülasyonsuz kültür koşullarında MPO+sitH3 ekspresyonu Behçet grubunda antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,024). PMA uyarımı sonrası Behçet grubunda çift pozitiflik oranlarının vasküler tromboz (p=0,003), granülomatöz polianjitis (p=0,013) ve antifosfolipid sendromu (p=0,007) gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde PSV-23 uyarımı sonrasında da Behçet grubunda çift pozitiflik oranlarının vasküler tromboz (p=0,009), granülomatöz polianjitis (p=0,004) ve antifosfolipid sendromu (p=0,021) gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu izlenmiştir (Şekil 11A).

Düşük dansiteli nötrofillerde yapılan akan hücre ölçer analizleri değerlendirildiğinde, sitH3 ekspresyonu; stimülasyonsuz, PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası Behçet grubunda vasküler tromboz, granülomatöz polianjitis ve antifosfolipid sendromu gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca PMA uyarımı sonrası granülomatöz polianjitis grubunda sitH3 ekspresyonunun vasküler tromboz grubuna kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,04) (Şekil 8B). MPO ekspresyonu stimülasyonsuz, PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası Behçet grubunda; vasküler tromboz, granülomatöz polianjitis ve antifosfolipid sendromu gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (tüm $p < 0,05$). Ayrıca hem stimülasyonsuz koşulda hem de PMA ve PSV-23 uyarımları sonrasında granülomatöz polianjitis grubunda MPO ekspresyonunun antifosfolipid sendromu

grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla p=0,02, p=0,035 ve p=0,018) (Şekil 11B). Benzer şekilde, düşük dansiteli nötrofillerde MPO+sitH3 çift pozitiflik oranları da stimülasyonsuz, PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası Behçet grubunda; vasküler tromboz, granülomatöz polianjitis ve antifosfolipid sendromu gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek saptanmıştır (tüm $p < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 11B).



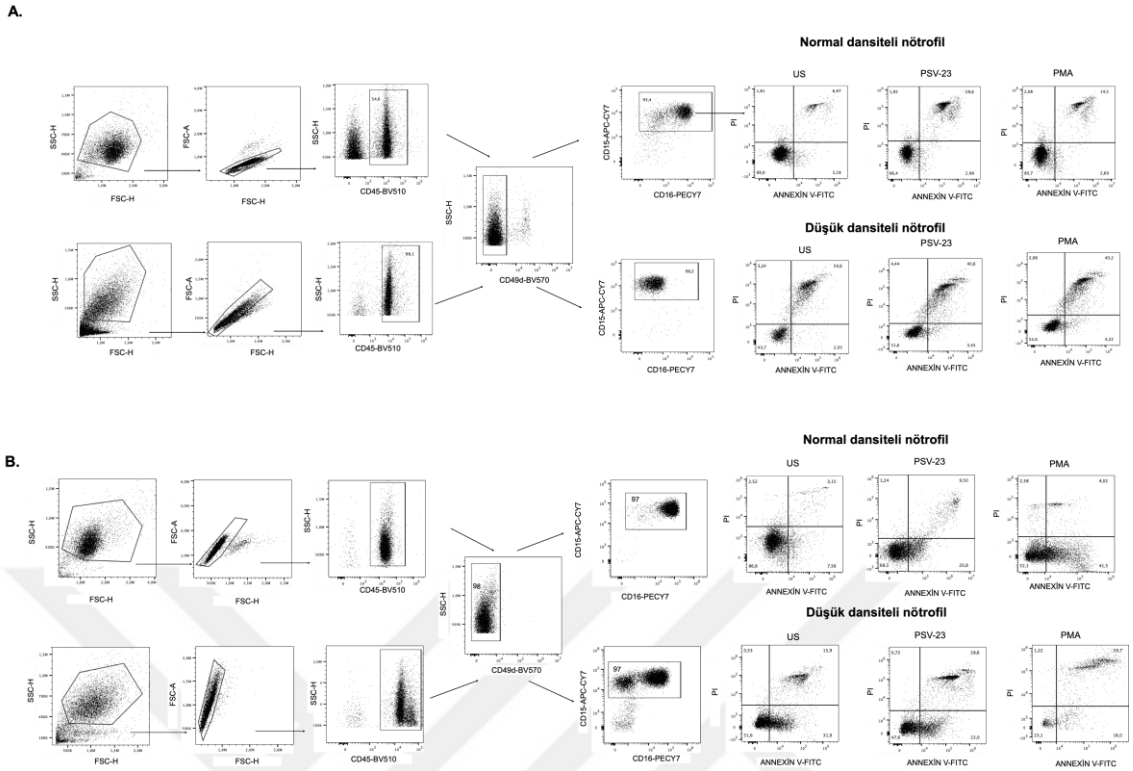
Şekil 11. Tüm hasta gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde PSV-23 aşı ve PMA uyarımları sonrası sitH3, MPO ve sitH3$^+$+MPO$^+$ ekspresyonlarının incelenmesi

A. Normal dansiteli ve B. Düşük dansiteli nötrofillerde sitH3, MPO ve sitH3$^+$ MPO$^+$ ekspresyon analizleri.

(sitH3: sitrülinlenmiş histon H3, MPO: miyeloperoksidaz, MPO$^+$sitH3: sitrulinlenmiş histon H3 ve miyeloperoksidaz birlikte eksprese eden)

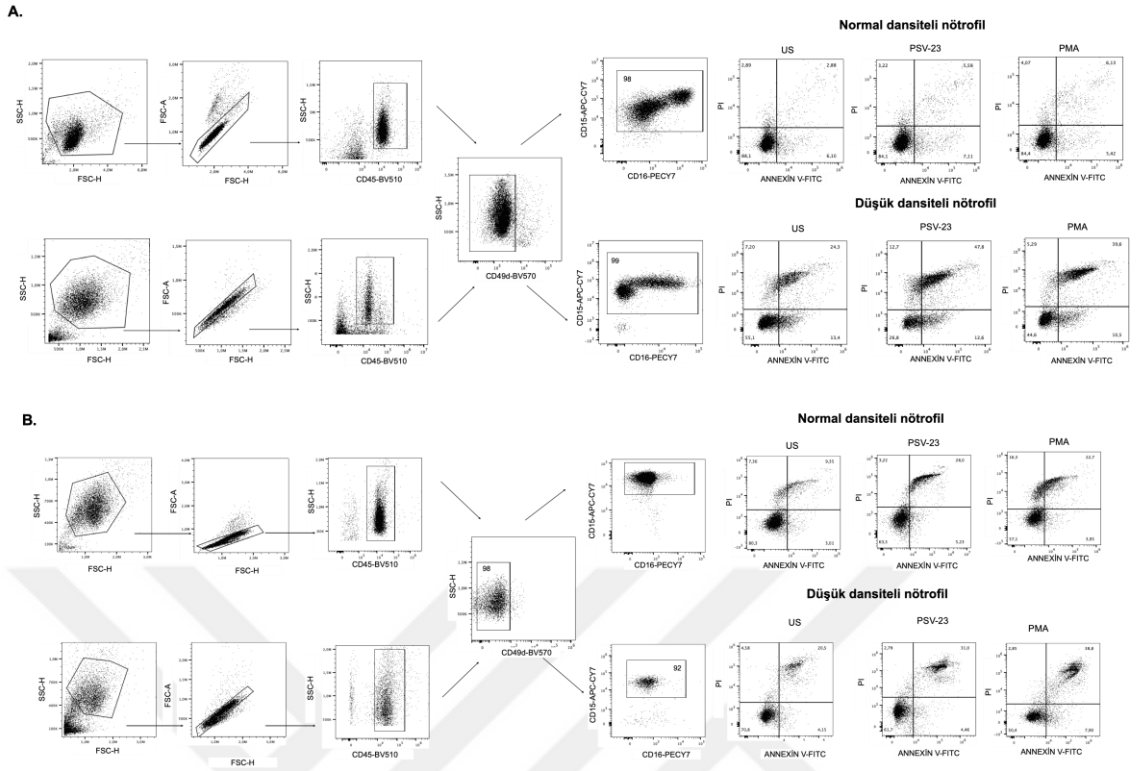
4.5. Nötrofil Alt Gruplarında Apoptotik İndeks ve Canlılık Oranlarının Belirlenmesi

Çalışma gruplarından izole edilen normal ve düşük dansiteli nötrofiller uyarımsız, PMA ve PSV-23 antijeni ile uyarım sonrası anneksin V ve propidyum iyodid (PI) boyası ile boyanmış ve inkübasyon aşamaları sonrası akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Vasküler Behçet hastası (Şekil 12A), granülomatöz polianjitis (Şekil 12B), vasküler tromboz (Şekil 13A) ve vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu (Şekil 13B) ait nötrofil alt gruplarının analiz programında kapılama stratejisi ve apoptotik indeks görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 12. Apoptotik indeksin nötrofil alt gruplarında akan hücre ölçer analizi.

Normal ve düşük dansiteli nötrofillerde apoptotik indeks anneksin V ve PI boyama metodu ile flow sitometrik incelenmiştir. Kapılama stratejisi ve kültür şartlarında uyarım sonrası **A.** Vasküler Behçet ve **B** Granülomatöz polianjitis hastasına ait akan hücre ölçer dot plot analiz görüntüleri görülmektedir (PI: propidyum iyodid).



Şekil 13. Apoptotik indeks akan hücre ölçer analizleri

A. Vasküler tromboz ve **B.** Vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu hastasına ait apoptotik indeks analiz görüntüleri.

Vasküler Behçet hastalarında normal dansiteli nötrofillerde, stimülasyonsuz duruma kıyasla PMA (p=0,011) ve PSV-23 (p=0,012) uyarımları sonrası apoptotik indekste anlamlı artış gözlenmiştir. Bu bulguyla uyumlu şekilde, uyarımlar sonrası canlılık oranlarında anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır (p=0,012) (Şekil 14A). Düşük dansiteli nötrofillerde ise farklı uyarım koşullarında apoptoz oranları açısından anlamlı bir fark görülmemekle birlikte, bu hücrelerin normal dansiteli nötrofillere göre genel olarak daha yüksek apoptotik indekse sahip olduğu görülmüştür (Şekil 14A).

Granülomatöz polianjitis hastalarında normal dansiteli nötrofillerde stimülasyonsuz koşula kıyasla PMA uyarımı sonrası apoptozda anlamlı artış (p=0,025) ve eşlik eden canlılık oranında azalma (p=0,021) gözlenmiştir (Şekil 14B). Düşük dansiteli nötrofillerde, PMA uyarımı sonrası apoptozda anlamlı artış saptanmıştır (p=0,035). Ayrıca canlılık oranının PMA uyarımı sonrası, unstimüle (p=0,035) ve PSV-23 (p=0,025) koşullarına kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 14B).

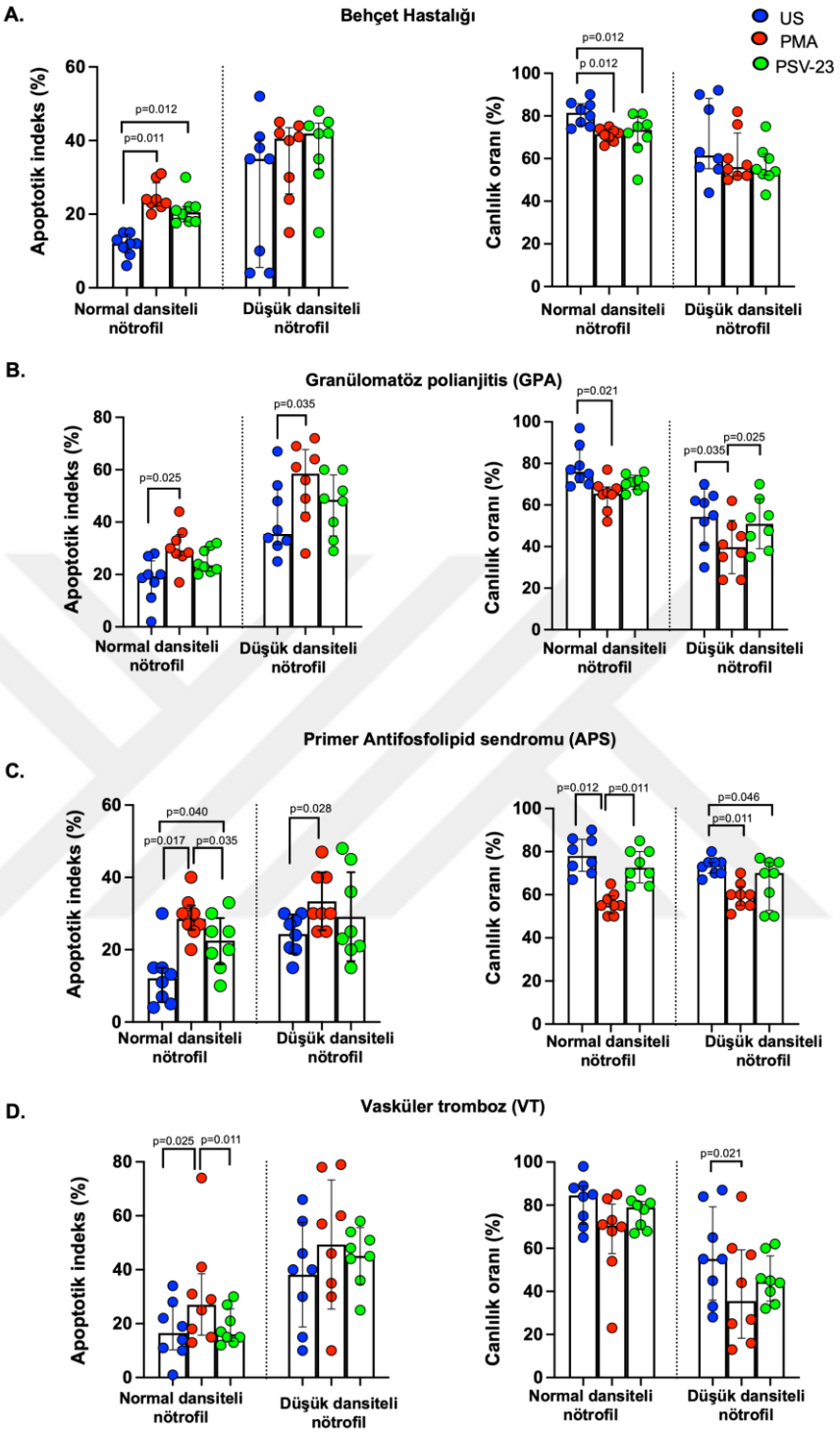
Vasküler trombozu olan primer antifosfolipid sendromu hastalarında, hem normal hem de düşük dansiteli nötrofillerde unstimüle koşullara kıyasla PMA (p=0,017, p=0,028, sırasıyla) ve PSV-23 (p=0,040) uyarımları sonrası apoptoz oranlarında artış

saptanmıştır. Normal dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası apoptoz oranlarının en yüksek düzeye ulaştığı ve bu değerin PSV-23 uyarımına kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,035). Bu doğrultuda, canlılık oranının PMA uyarımı sonrası en düşük düzeyde olduğu ve bu azalmanın unstimüle (p=0,012) ve PSV-23 (p=0,011) koşullarına kıyasla anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 14C). Düşük dansiteli nötrofillerde ise bazal apoptoz oranlarının normal dansiteli nötrofillere göre daha yüksek olduğu ve PMA uyarımı sonrası apoptozda anlamlı artış görüldüğü saptanmıştır (p=0,028). Canlılık oranının en yüksek stimülasyonsuz koşulda, en düşük PMA uyarımı altında olduğu belirlenmiştir. Unstimüle duruma kıyasla PMA (p=0,011) ve PSV-23 (p=0,046) uyarımları sonrası canlılık oranında anlamlı azalma gözlenmiştir (Şekil 14C).

Kontrol grubu olarak vasküler trombozu bulunan hastalarda, normal dansiteli nötrofillerde apoptotik indeks PMA uyarımı sonrası, stimülasyonsuz (p=0,025) ve PSV-23 (p=0,011) koşullarına kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Canlılık oranı da düşük dansiteli nötrofillerde stimülasyonsuz koşula göre PMA uyarımı sonrası azalmıştır (p=0,021). Düşük dansiteli nötrofillerde apoptotik indeks normal dansiteli nötrofillerden daha yüksek olmakla birlikte, farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir (Şekil 14D).

Hastalık gruplarında kültür sonrası her bir uyarımın normal ve düşük dansiteli nötrofillerde apoptotik indeks ve canlılık oranlarına etkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Vasküler Behçet grubunda düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası apoptoz oranlarının aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,030 ve p= 0,017, sırasıyla). Ayrıca düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası apoptoz oranının, normal dansiteli nötrofillerin stimülasyonsuz durumundan daha yüksek olduğu saptandı (p=0,012). Granülomatöz polianjitis grubunda; Behçet grubuna benzer şekilde düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası apoptoz oranlarının aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden daha yüksek olduğu görüldü (p= 0,017 ve p= 0,012, sırasıyla). Ayrıca düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası apoptoz oranının, normal dansiteli nötrofillerin stimülasyonsuz durumundan daha yüksek olduğu saptandı (p= 0,012). Vasküler trombozu olan primer antifosfolipid sendromu grubunda düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası apoptoz oranının, normal dansiteli nötrofillerin stimülasyonsuz şarta göre yüksek olduğu görüldü (p= 0,017). PSV-23 aşı ile uyarılmış düşük dansiteli nötrofillerde canlılık oranının aynı koşullardaki normal

dansiteli nötrofilleden yüksek olduğu saptandı (p= 0,027). İdyopatik vasküler tromboz grubunda ise düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası apoptoz oranlarının aynı koşullardaki normal dansiteli nötrofillerden daha yüksek olduğu saptandı (p= 0,025 ve p= 0,012, sırasıyla). Ayrıca düşük dansiteli nötrofillerde PMA uyarımı sonrası apoptoz oranının, normal dansiteli nötrofillerin stimülasyonsuz durumundan daha yüksek olduğu görüldü (p= 0,012).



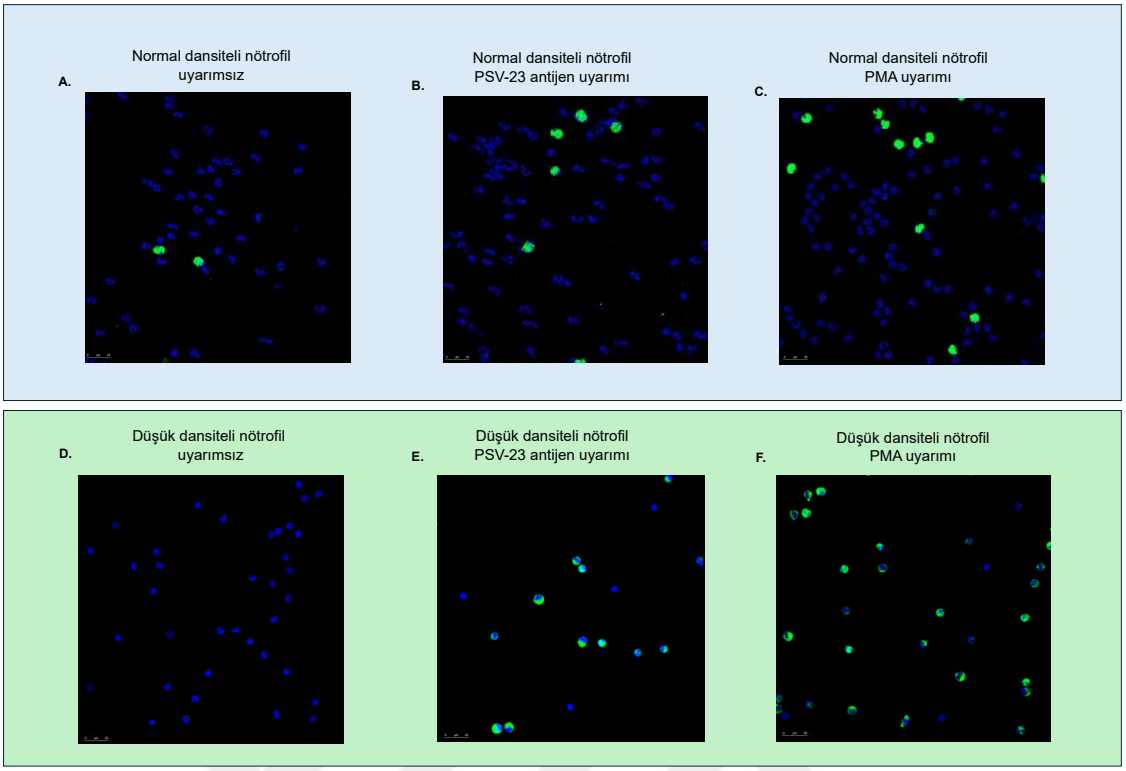
Şekil 14. Nötrofil alt gruplarında farklı uyaranların hastalık gruplarında apoptotik indeks ve canlılık oranlarına etkisi

A. Vasküler Behçet hastalığı, B. Granülomatöz polianjitis, C. Vasküler trombotik Primer antifosfolipid sendromu ve D. Vasküler tromboz hasta gruplarında düşük ve normal dansiteli nötrofillerin farklı uyaranlara karşı apoptotik indeks ve canlılık oranlarının akan hücre ölçer analiz sonuçları.

4.6. Nötrofil Ekstrasellüler Tuzakların Fluoresan Görüntü Analizi

Konfokal görüntülenmesi deneylerimizde RPMI1640 medyumunda süspanse edilen nötrofiller kuyucuk başına $2x10^5$ hücre /ml hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiştir. Uyarımsız, PMA (10 nM) ve pnömokok antijeni (100ng/ml) ile 4 saat 37 ^oC'de inkübasyon sonrası yöntem bölümünde belirtilen boyama aşamaları tamamlanmıştır. Düşük dansiteli nötrofillerin, morfolojik olarak normal dansiteli nötrofillerden belirgin farklılıklar gösterdiği izlenmiştir. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde, düşük dansiteli nötrofillerin çekirdek morfolojisinin sıklıkla hiposegmentli veya yuvarlak yapıda olduğu, buna karşın normal dansiteli nötrofillerin tipik olarak multilobüler çekirdeğe sahip olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 15 A-F). MPO, nötrofil granüllerinde bulunan ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde rol oynayan bir enzimdir. MPO artışı, nötrofillerin aktivasyon durumunu yansıtan önemli bir göstergedir. Çalışmada konfokal mikroskopi elde edilen bulguları görsel olarak güçlendirmek ve normal ve düşük dansiteli nötrofillerin morfolojik farklılıklarını ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır.

Normal ve düşük dansiteli nötrofillerin kültür sonrası hem hücre dışına salgılanan fibröz ağlarda bulunan hem de hücre zarlarında permeabilizasyon oluşturarak hücre içi MPO ekspresyonunu FITC işaretli MPO antikoru kullanarak eş zamanlı olarak görüntülemeyi hedefledik. Aynı zamanda nötrofil nukleusları DAPI ile işaretlenmiştir. Şekil 15'de herhangi bir hastalıkla ilişkisi gösterilememiş vasküler trombozu olan hastadan izole edilen hem normal (Şekil 15 A-B-C) hem de düşük dansiteli nötrofillerde (Şekil 15 D-E-F) uyarımsız şartlara göre PMA ve PSV-23 aşı uyarımlar hücre içi MPO boyaması arttırdığı gözlemlenmiştir. Pnömokok antijeni ile uyarılan nötrofil alt gruplarında özellikle düşük dansiteli nötrofillerde hücre içi MPO ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

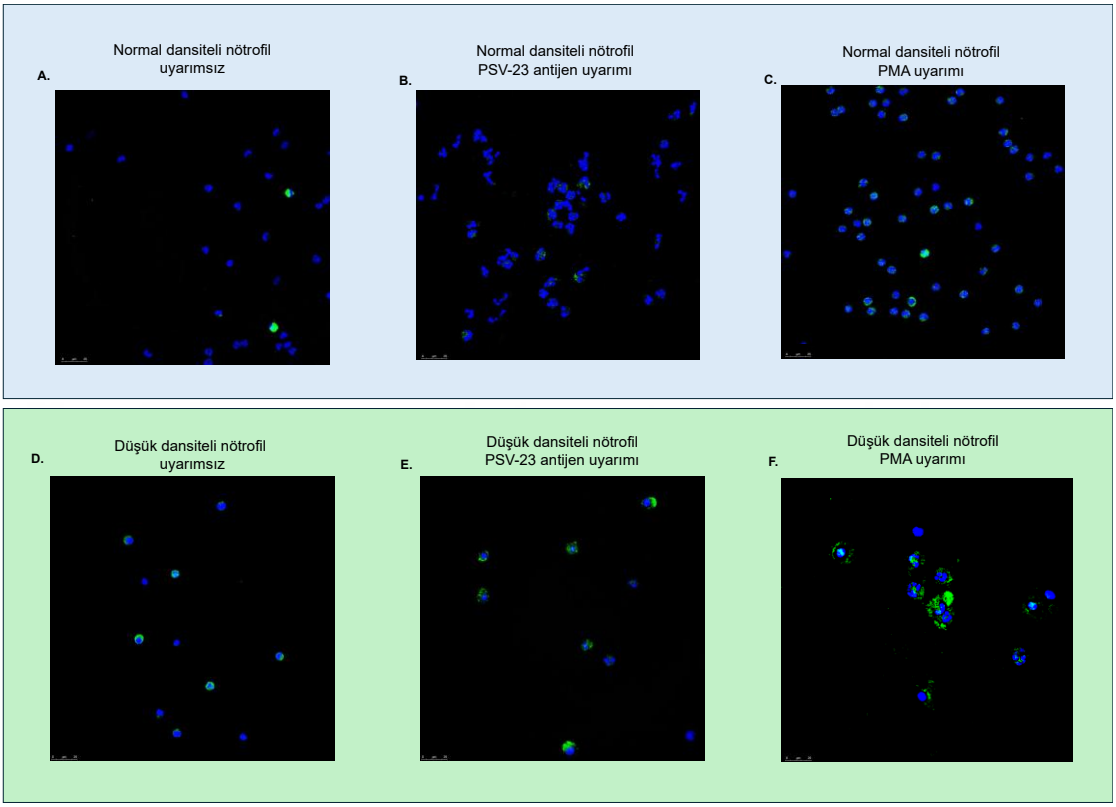


Şekil 15. Nötrofil alt gruplarında farklı uyaranların hastalık gruplarında apoptotik indeks ve canlılık oranlarına etkisi

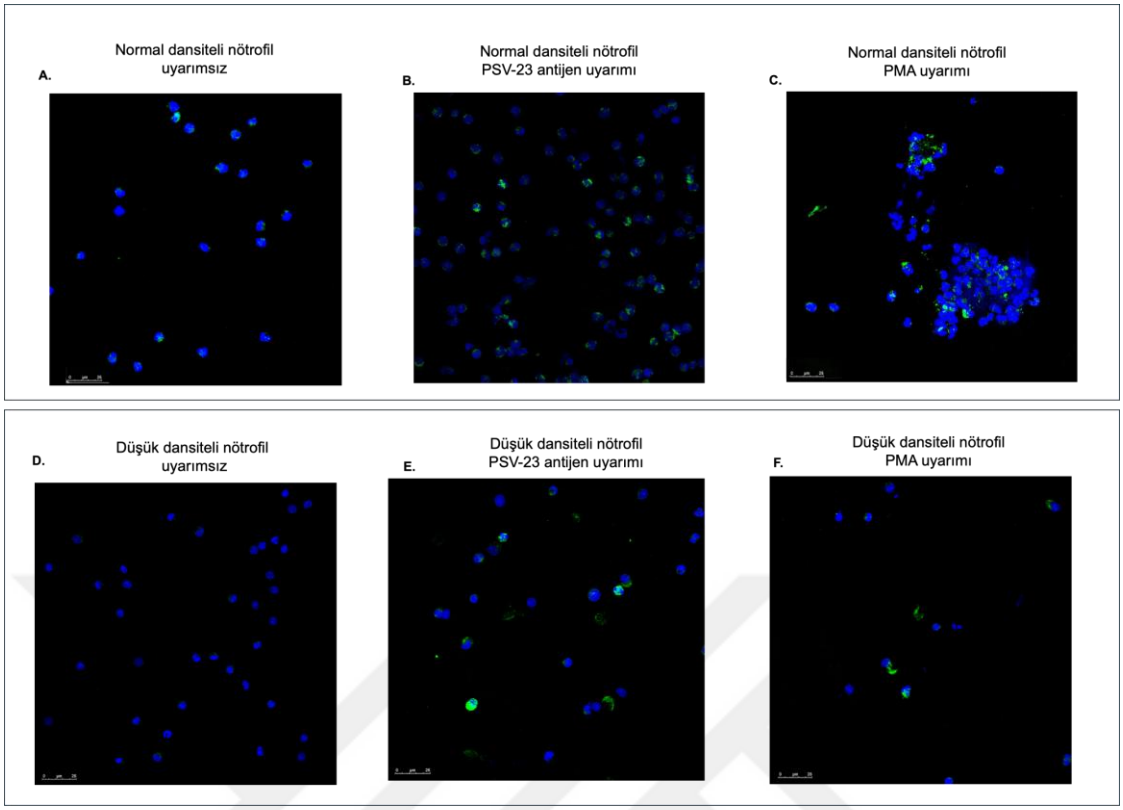
Herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş vasküler trombozu olan hastadan izole edilen nötrofil alt gruplarında NETosis bulgusu olarak hücre dışı konfokal mikroskop MPO ekspresyon görüntüleri.

Behçet hastalığı tanısı olup vasküler trombozu olan hastalardan izole edilen hem normal (Şekil 16 A-B-C), (Şekil 17 A-B-C) ve düşük dansiteli nötrofillerde (Şekil 16 D-E-F), (Şekil 17 D-E-F) MPO-FITC antikor boyaması yapılmıştır. İki farklı Behçet hastasına ait konfokal görüntüler incelendiğinde ilk hasta örneğinde normal dansiteli nötrofillerde uyarımsız şartlarda spontan NETosis bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 16A). Uyarımsız şartlara göre PMA ve PSV-23 aşı uyarımları ile hücre içi MPO boyamasının artmış ancak NETosis bulgusu gözlemlenmemiştir (Şekil 16 B-C). Yine aynı hasta örneğinde düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının normal dansiteli nötrofillerle kıyaslandığında MPO ekspresyonunun hücre dışında dağılımı NETosis morfolojisi ile uyumlu olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla düşük dansiteli nötrofillerin PMA'ya güçlü yanıt verdiği saptanmıştır. PSV-23 antijen uyarımına yanıt olarak MPO ekspresyonu stimülasyonsuz şarta göre artmış, fakat PMA'dan daha düşük bir yanıt oluşturmuştur (Şekil 16 D-E-F). Seçilen ikinci örnek olarak Behçet hastasından izole edilen nötrofillerin kültür sonrası konfokal mikroskopi görüntüsü incelendiğinde hem normal (Şekil 17A-C) hem de düşük dansiteli

nötrofillerde (Şekil 17E-F) PMA ve aşı uyarım koşulları NETosis (hücre dışı MPO görüntüsü) bulgusu saptanmıştır.

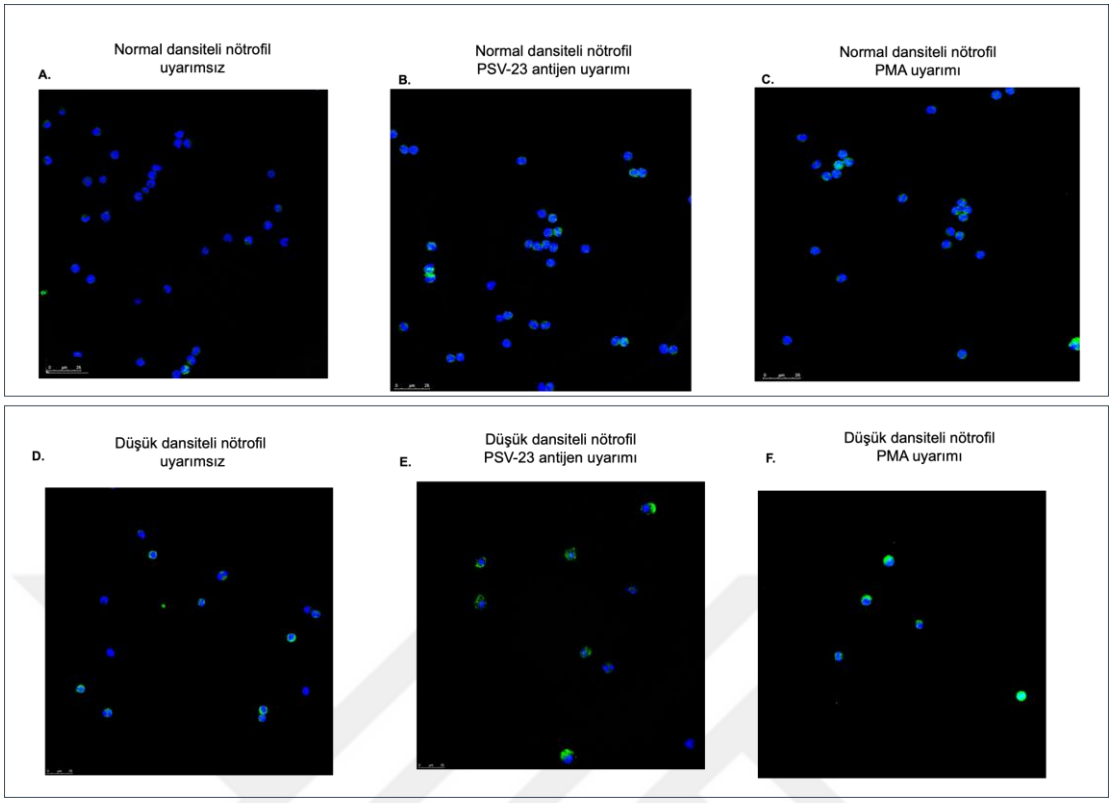


Şekil 16. Farklı uyarımların normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteci olarak MPO ekspresyonuna etkisi.
Vasküler trombozu olan Behçet hastasından izole edilen nötrofil alt gruplarında kültür aşaması sonrası MPO ekspresyonunun konfofal mikroskop görüntüleri.



Şekil 17. Behçet hasta grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde PMA ve PSV-23 antijen uyarımlarının MPO ekspresyonu üzerine etkilerinin konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi.

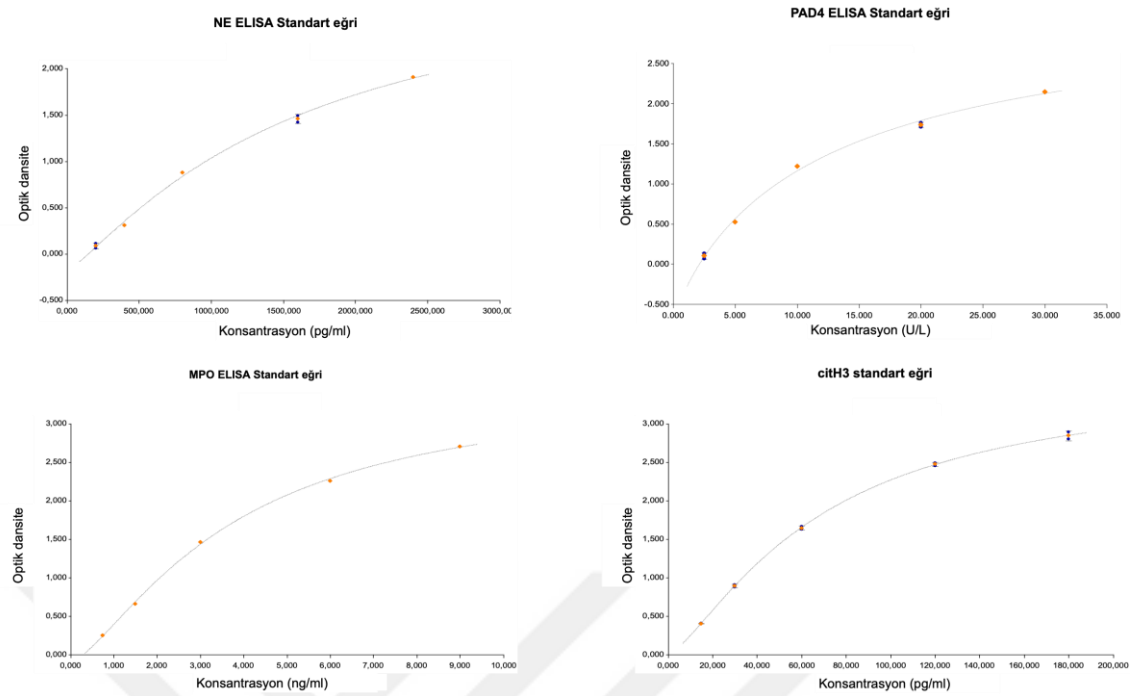
Vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu hastalarından elde edilen konfokal mikroskopi görüntülerinde hem uyarımsız hem de PMA ve PSV-23 antijen uyarım sonrası normal ve düşük dansiteli nötrofillerde hücre içi MPO ekspresyonu görüntülenmekle birlikte, NETosis bulgusuna (hücre dışı MPO) rastlanmamıştır (Şekil 18A-F).



Şekil 18. Farklı uyarımların normal ve düşük dansiteli nötrofillerde NETosis belirteci olarak MPO ekspresyonuna etkisi.
Antifosfolipid sendromu olan hastasından izole edilen nötrofil alt gruplarında kültür aşaması sonrası MPO ekspresyonunun konfokal mikroskop görüntüleri.

4.7. Serumda ve Kültür Üst Sıvılarında NETosis Belirteçlerinin Düzeylerinin Belirlenmesi

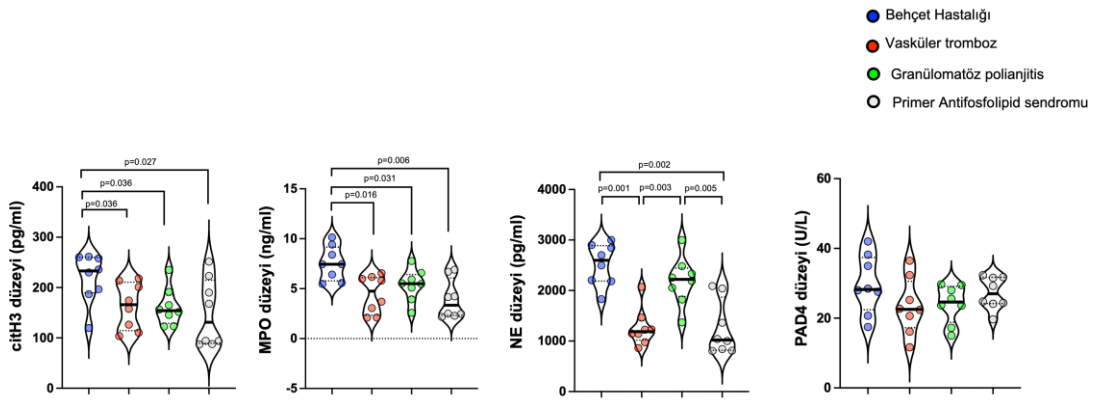
Çalışma gruplarından izole edilen serum örnekleri ile nötrofillerin stimülasyonsuz, PMA ve pnömokok antijeni (PSV-23) ile stimüle edilmiş kültür üst sıvı örneklerinde sitrolinlenmiş Histon H3 (cit H3), peptidil arjinin deiminaz 4 (PAD4), miyeloperoksidaz (MPO) ve nötrofil elastaz (NE) ELISA düzeyleri ölçülmüştür. Serum örneklerinde ELISA kitleri başarılı şekilde çalışılmış ve her bir kite ait standart eğri grafikleri Şekil 19'da sunulmuştur.



Şekil 19. NE, PAD4, MPO ve citH3 ELISA kitlerine ait standart eğriler
(NE: nötrofil elastaz; PAD4: peptidil arjinin deiminaz 4; MPO: miyeloperoksidaz; citH3: sitrulinlenmiş histon H3)

4.7.1. Hasta Grupları Serum Örneklerinde ELISA Sonuçları

Hasta grupları arasında serumda ELISA yöntemi ile ölçülen NETosis belirteçleri karşılaştırıldığında, sitH3 düzeylerinin vasküler Behçet hastalığı grubunda vasküler tromboz (p=0,036), granülomatöz polianjitis (p=0,036) ve vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu (p=0,027) gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Serum MPO düzeyleri analiz edildiğinde Behçet hastalığı grubunda vasküler tromboz (p=0,016), granülomatöz polianjitis (p=0,031) ve antifosfolipid sendromu (p=0,006) gruplarına kıyasla yüksek saptandı. PAD4 düzeyleri açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Serum NE düzeyleri değerlendirildiğinde, Behçet grubunda NE düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,001) ve primer antifosfolipid sendromu (p=0,002) gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, granülomatöz polianjitis grubunda da NE düzeyleri vasküler tromboz (p=0,003) ve antifosfolipid sendromu gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,005) (Şekil 20).



Şekil 20. Hastalara ait serum örneklerinde citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri
(citH3: sitrulinlenmiş histon H3; MPO: miyeloperoksidaz; NE: nötrofil elastaz; PAD4: peptidil arjinin deiminaz 4)

4.7.2. Normal ve Düşük Dansiteli Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 ELISA Sonuçları

Behçet grubunda normal dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında citH3 düzeylerinin, stimülasyonsuz koşullara kıyasla PMA (p=0,017) ve PSV-23 uyarımları (p=0,035) sonrasında anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. PSV-23 uyarımı sonrasında MPO düzeylerinin hem stimülasyonsuz (p=0,017) hem de PMA uyarımına (p=0,021) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, PAD4 düzeylerinin de PSV-23 uyarımı sonrası hem stimülasyonsuz hem de PMA koşullarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,035). NE düzeyleri açısından ise farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 21A).Behçet grubunda düşük dansiteli nötrofillerde MPO düzeyleri açısından farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Buna karşın, sitH3 düzeylerinin PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası stimülasyonsuz koşula kıyasla anlamlı olarak arttığı görülmüştür (p=0,012). NE ve PAD4 düzeylerinin ise PSV-23 uyarımı sonrası stimülasyonsuz koşula göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla p=0,036 ve p=0,012) (Şekil 21A).

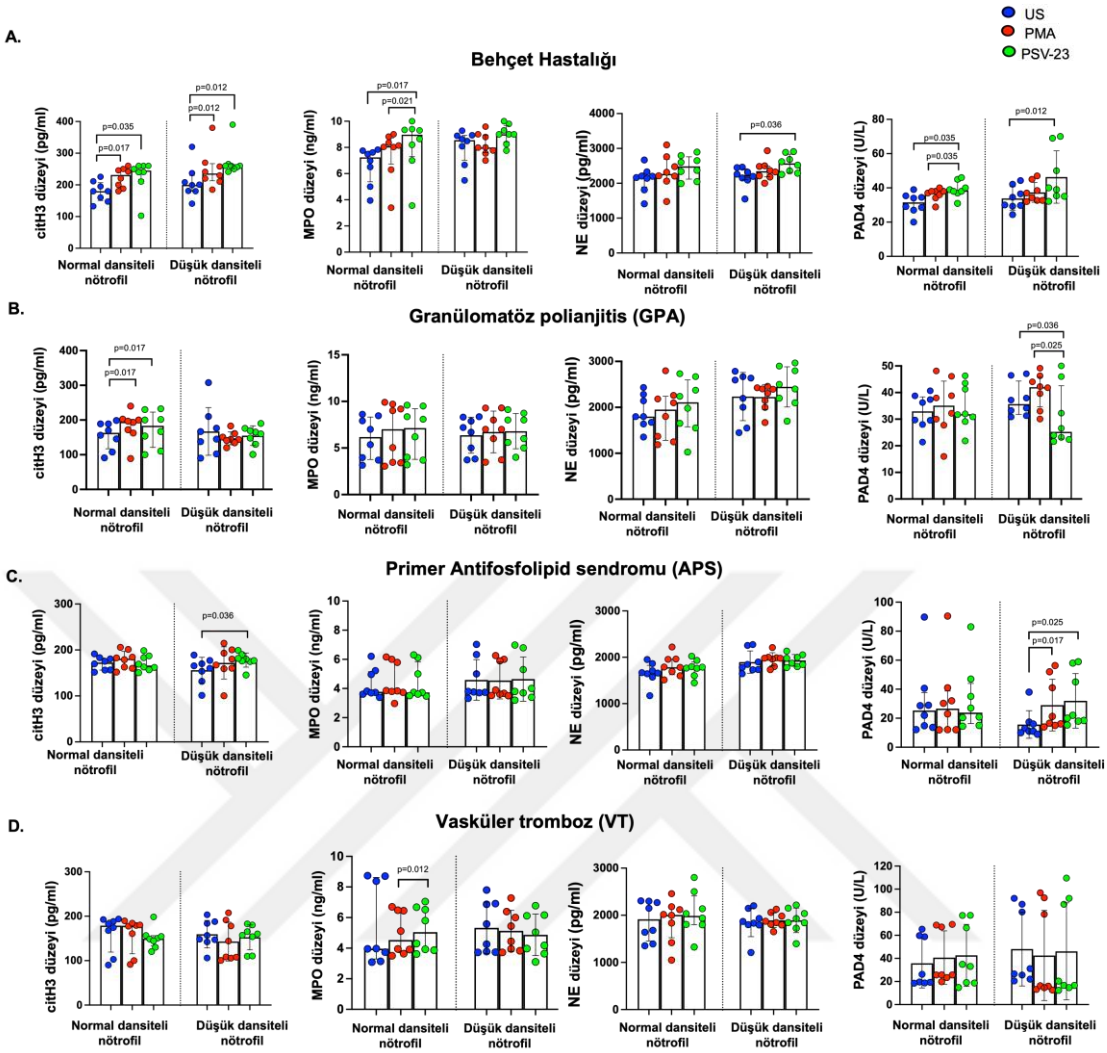
Granülomatöz polianjitis grubunda normal dansiteli nötrofillerde citH3 düzeylerinin, stimülasyonsuz koşullara kıyasla PMA ve PSV-23 uyarımları sonrasında anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (p=0,017). Buna karşılık, MPO, PAD4 ve NE düzeyleri açısından farklı uyarım koşulları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (Şekil 21B). Düşük dansiteli nötrofillerde ise anlamlı farklılık yalnızca PAD4 düzeylerinde saptanmıştır. PAD4 düzeylerinin PSV-23 uyarımı sonrasında hem

unstimüle (p=0,036) hem de PMA uyarımına (p=0,025) kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 21B).

Antifosfolipid sendromu hastalarında, yalnızca düşük dansiteli nötrofillerde sitH3 düzeylerinin, stimülasyonsuz koşula kıyasla PSV-23 uyarımı sonrası anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (p=0,036). Düşük dansiteli nötrofillerde PAD4 düzeyleri stimülasyonsuz koşula göre PMA ve PSV-23 uyarımları sonrası artmıştır (p=0,017 ve p=0,025, sırasıyla) (Şekil 21C).

İdiyopatik vasküler tromboz grubunda ise yalnızca normal dansiteli nötrofillerde PSV-23 uyarımı sonrası MPO düzeylerinin PMA uyarımına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,012) (Şekil 21D).

Hastalık gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde kültür üst sıvılarında sitrolinlenmiş Histon H3, PAD4, MPO ve NE düzeylerindeki farklılıklar araştırılmıştır. Vasküler Behçet grubunda, düşük dansiteli nötrofillerin kültür üst sıvılarında, stimülasyonsuz koşullarda ölçülen MPO düzeyinin, normal dansiteli nötrofillere kıyasla daha yüksek olduğu saptandı (p= 0,012). Granülomatöz polianjitis ve vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofi kültür üst sıvılarında ELISA ile belirlenen NETosis belirteçleri aynı koşullar altında yapılan ölçümlerde anlamlı bir farklılık göstermedi. İdyopatik vasküler tromboz grubunda ise düşük dansiteli nötrofiller kültür üst sıvılarında stimülasyonsuz durumda normal dansiteli nötrofillerden sadece PAD4 düzeyi yüksek saptanmıştır (p= 0,025).



Şekil 21. Normal ve düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri

(citH3: sitrulinlenmiş histon H3; MPO: miyeloperoksidaz; NE: nötrofil elastaz; PAD4: peptidil arjinin deiminaz 4)

4.7.2.1. Tüm Hasta Gruplarında Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 ELISA Sonuçları

Normal dansiteli nötrofillerde kültür üst sıvısı citH3 ELISA düzeyleri analiz edildiğinde stimülasyonsuz şartlarda anlamlı bir fark saptanmamıştır. PMA ve PSV-23 uyarımları sonrasında Behçet grubunda ortalama citH3 düzeylerinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. PMA uyarımı sonrası citH3 düzeyleri Behçet grubunda vasküler tromboz (p=0,003) ve antifosfolipid sendromu (p=0,012) gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PSV-23 uyarımı sonrasında ise Behçet grubunda citH3 düzeyleri vasküler tromboz (p=0,012), granülomatöz polianjitis (p=0,016) ve antifosfolipid sendromu (p=0,012) gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha

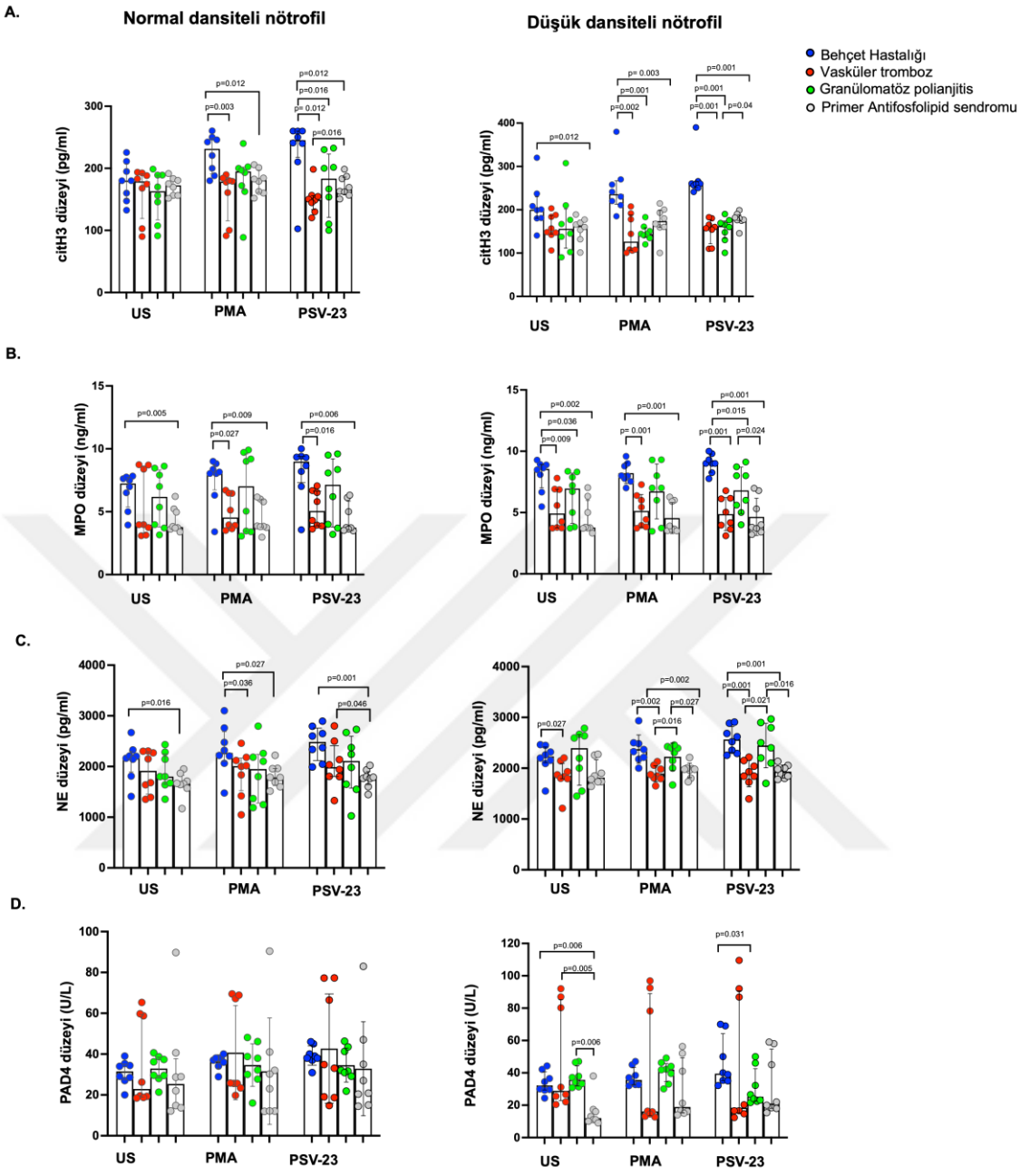
yüksek saptanmıştır. Ayrıca, PSV-23 uyarımı sonrası vasküler tromboz grubunda citH3 düzeylerinin antifosfolipid sendromu grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,016). (Şekil 22A). Düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında stimülasyonsuz koşulda Behçet grubunda citH3 düzeyleri antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,012). PMA uyarımı sonrası citH3 düzeyleri Behçet grubunda vasküler tromboz (p=0,002), granülomatöz polianjitis (p=0,001) ve antifosfolipid sendromu (p=0,003) gruplarına göre yüksek saptanmıştır. PSV-23 uyarımı sonrasında da benzer şekilde Behçet grubunda citH3 düzeylerinin tüm diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (p=0,001). Ayrıca, antifosfolipid sendromu grubunda citH3 düzeylerinin granülomatöz polianjitis grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,040) (Şekil 22A).

MPO ELISA düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, tüm uyarım koşullarında en yüksek düzeylerin Behçet grubunda olduğu görülmüştür. Stimülasyonsuz koşulda Behçet grubunda MPO düzeylerinin antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır (p= 0,005). PMA uyarımı sonrasında Behçet grubunda MPO düzeyleri vasküler tromboz (p=0,027) ve antifosfolipid sendromu (p=0.009) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Yine, PSV-23 uyarımı sonrası da Behçet grubunda MPO düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,016) ve antifosfolipid sendromu (p=0,006) gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 22B). Düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında stimülasyonsuz koşulda Behçet grubunda MPO düzeyleri vasküler tromboz (p=0,009), granülomatöz polianjitis (p=0,036) ve antifosfolipid sendromu (p=0,002) gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PMA uyarımı sonrasında da Behçet grubunda MPO düzeylerinin vasküler tromboz ve antifosfolipid sendromu gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,001). PSV-23 uyarımı sonrası ise Behçet grubunda MPO düzeylerinin tüm diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Ayrıca, granülomatöz polianjitis grubunda MPO düzeylerinin antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,024) (Şekil 22B).

Kültür üst sıvıları NE düzeyleri analiz edildiğinde stimülasyonsuz koşulda Behçet grubunda NE düzeyleri antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0,016). PMA uyarımı sonrasında Behçet

grubunda NE düzeylerinin vasküler tromboz (p=0.036) ve antifosfolipid sendromu (p=0,027) gruplarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. PSV-23 uyarımı sonrası ise Behçet grubunda NE düzeylerinin antifosfolipid sendromu grubuna göre (p=0,001) anlamlı derecede daha yüksek olduğu, ayrıca vasküler tromboz grubunda NE düzeylerinin antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,046) (Şekil 22C). Düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında NE düzeyleri değerlendirildiğinde, stimülasyonsuz koşulda Behçet grubunda NE düzeylerinin vasküler tromboz grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,027). PMA uyarımı sonrasında Behçet grubunda NE düzeylerinin vasküler tromboz ve antifosfolipid sendromu gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür (p=0,002). Ayrıca, granülomatöz polianjitis grubunda da NE düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,016) ve antifosfolipid sendromu (p=0,027) gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 22C). PSV-23 uyarımı sonrası da benzer şekilde Behçet grubunda NE düzeylerinin vasküler tromboz ve antifosfolipid sendromu gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,001). Ayrıca granülomatöz polianjitis grubunda da NE düzeylerinin vasküler tromboz (p=0,021) ve antifosfolipid sendromu (p=0,016) gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 22C).

PAD4 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık yalnızca düşük dansiteli nötrofillerde gözlenmiştir. Stimülasyonsuz koşulda Behçet, vasküler tromboz ve granülomatöz polianjitis gruplarında PAD4 düzeyleri antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,006, p=0,005 ve p=0,006). PMA uyarımı sonrası gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmazken, PSV-23 uyarımı sonrasında Behçet grubunda PAD4 düzeylerinin granülomatöz polianjitis grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,031) (Şekil 22D).

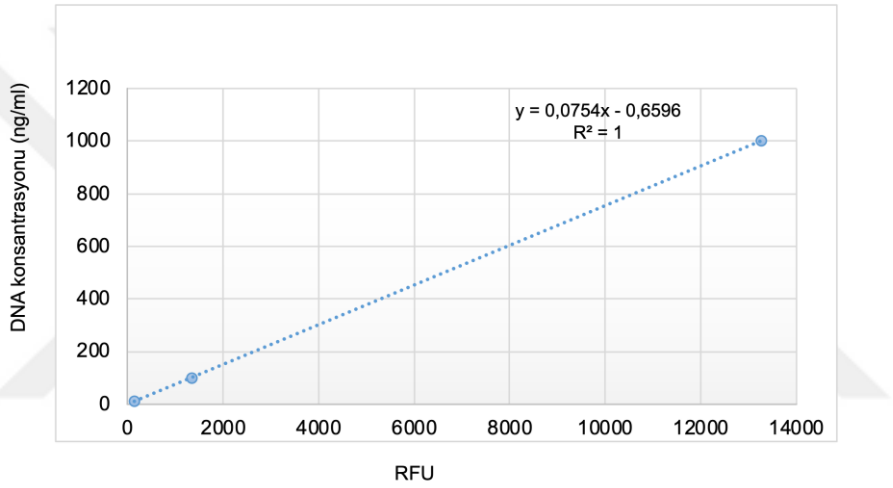


Şekil 22. Tüm hastalık gruplarında nötrofil kültür üst sıvılarında citH3, MPO, NE ve PAD4 düzeyleri

(citH3: sitrulinlenmiş histon H3; MPO: miyeloperoksidaz; NE: nötrofil elastaz; PAD4: peptidil arjinin deiminaz 4)

4.7.3. Plazma ve Nötrofil Kültür Üst Sıvılarında Hücresiz Çift zincirli Serbest DNA (cf-dsDNA) Düzeyleri

Çalışma gruplarından izole edilen plazma örnekleri ile nötrofillerin stimülasyonsuz, PMA ve pnömokok antijeni (PSV-23) ile stimüle edilmiş kültür üst sıvı örneklerinde cf-dsDNA düzeyleri ölçülmüştür. Plazma ve kültür üst sıvısı örneklerinde Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit ile cf-dsDNA miktarı florometrik yöntem ile ölçülmüştür. Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kitleri başarılı şekilde çalışılmış ve kite ait standart eğri grafiği Şekil 23'de sunulmuştur.



Şekil 23. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit'e ait standart eğri

Plazma cf-dsDNA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 24A). Behçet hastalarında normal dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında uyarımsız koşula kıyasla PMA uyarımı ($p= 0,05$) ve PSV-23 aşı uyarımları ($p= 0,043$) ile cf-dsDNA düzeylerinda anlamlı artış olduğu görülmüştür. Düşük dansiteli nötrofllerde stimülasyonsuz şarta göre PSV-23 uyarımı sonrası anlamlı artış görülmüştür ($p= 0,036$) (Şekil 24B). Nötrofil alt grupları karşılaştırıldığında düşük dansiteli nötrofillerde klasik nötrofillere göre PSV-23 aşı uyarımına yanıtın anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p= 0,018$).

Granülomatöz polianjitis hastalarında normal dansiteli nötrofillerde PMA ($p= 0,012$) ve PSV-23 antijenik uyarımları ($p= 0,036$) ile cf-dsDNA düzeylerinde anlamlı artış olduğu saptanmasına rağmen düşük dansiteli nötrofillerde farklı uyarım şartlarında cf-dsDNA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 24B).

İdiyopatik vasküler tromboz hastalarında normal dansiteli nötrofillerde PSV-23 aşı uyarımına PMA uyarımına göre daha yüksek cf-dsDNA yanıtı olduğu görülmüştür (p= 0,036), düşük dansiteli nötrofillerde farklı koşullarda anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 24B).

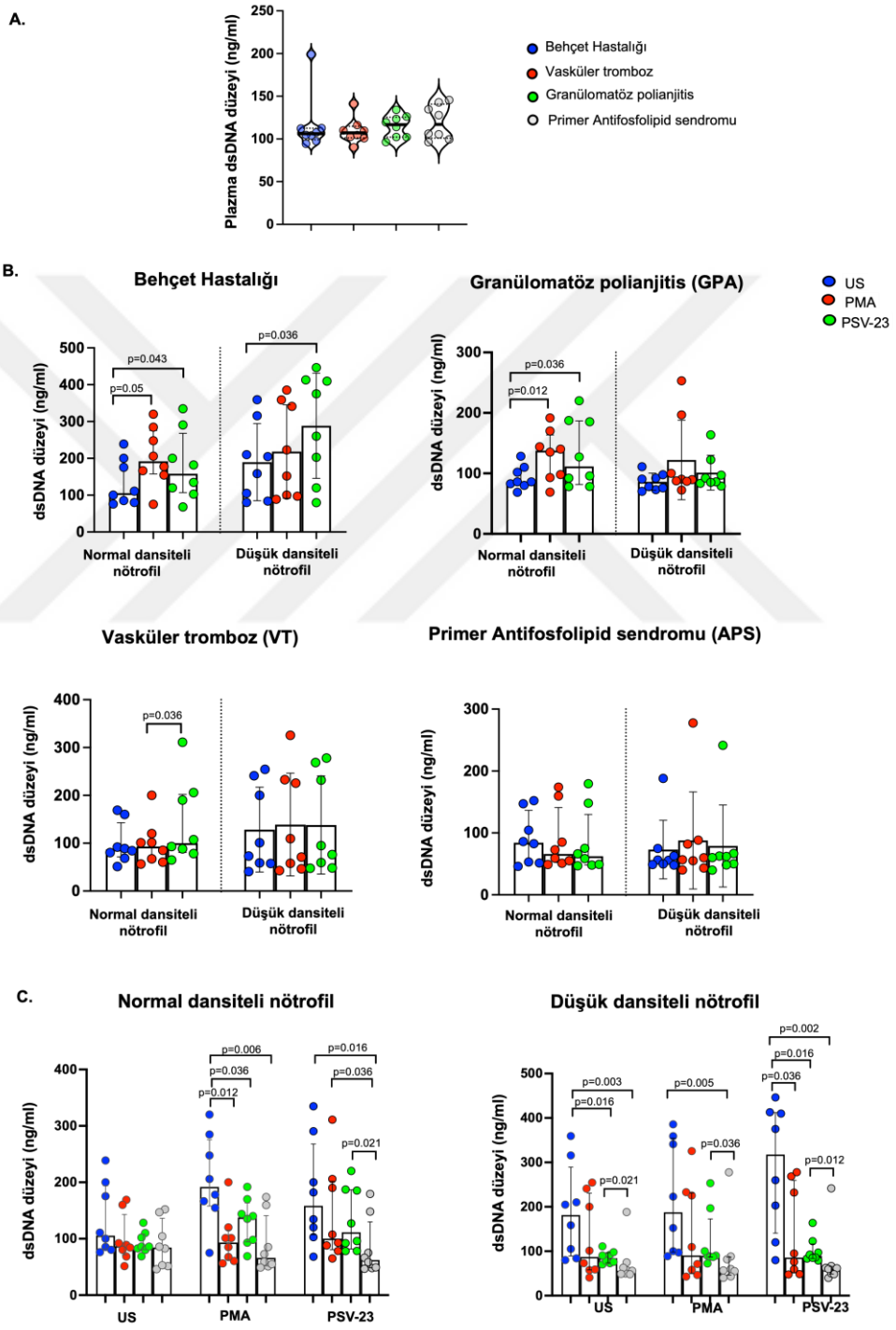
Vasküler trombozu olan primer antifosfolipid sendromu hastalarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerde farklı uyarım koşullarında cf-dsDNA yanıtı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. (Şekil 24B).

Tüm hasta grupları birlikte değerlendirildiğinde, normal dansiteli nötrofillerde stimülasyonsuz koşulda serum cf-dsDNA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). PMA uyarımı ile cf-dsDNA düzeyleri Behçet grubunda vasküler tromboz (p=0,012), granülomatöz polianjitis (p=0,036) ve primer antifosfolipid sendromu (p=0,006) gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Şekil 24C). PSV-23 uyarımı sonrası ise cf-dsDNA düzeyleri Behçet, vasküler tromboz ve granülomatöz polianjitis gruplarında antifosfolipid sendromu grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0,016, p=0,036 ve p=0,020, sırasıyla) (Şekil 24C). Tüm koşullarda en düşük cf-dsDNA düzeyleri antifosfolipid sendromu grubunda izlenmiştir.

Düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvıları cf-dsDNA sonuçları incelendiğinde stimülasyonsuz koşulda, Behçet grubunda cf-dsDNA düzeyleri granülomatöz polianjitis grubuna göre yüksek bulunmuştur (p=0,016). Ayrıca, Behçet ve granülomatöz polianjitis gruplarında cf-dsDNA düzeyleri antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (sırasıyla p=0,030 ve p=0,021) PMA uyarımı sonrası, cf-dsDNA düzeyleri Behçet ve granülomatöz polianjitis gruplarında antifosfolipid sendromu grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p= 0,005 ve p= 0,036, sırasıyla) (Şekil 24C). PSV-23 uyarımı sonrasında ise, Behçet grubunda cf-dsDNA düzeyleri vasküler tromboz (p= 0,036), granülomatöz polianjitis (p=0.016) ve antifosfolipid sendromu (p= 0,002) gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Granülomatöz polianjitis grubunda da cf-dsDNA düzeyleri antifosfolipid sendromu grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur (p= 0,012) (Şekil 24C).

Hastalık gruplarında normal ve düşük dansiteli nötrofillerin kültür üst sıvılarında cf-dsDNA düzeyleri her bir uyaran için karşılaştırılmıştır. Her bir hastalık grubunda

kendi içinde değerlendirilen normal ve düşük dansiteli nötrofiller arasında cf-dsDNA düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Şekil 24. Hücresiz çift zincirli serbest DNA (cf-dsDNA) analiz grafikleri

A. Hasta gruplarından izole edilen plazma örneklerinde cf-dsDNA düzeyleri B. Tüm hasta gruplarında nötrofil alt gruplarında kültür üst sıvısı cf-dsDNA düzeyleri. C. Her bir hasta grubunda normal ve düşük dansiteli nötrofillerde uyarımsız, PMA ve PSV-23 uyarımı sonrası toplanan kültür üst sıvılarında cf-dsDNA ölçüm sonuçları (cf-dsDNA: hücre dışı çift sarmallı DNA).

4.7.4. Serum ve Nötrofil Kültür Üst Sıvıları NETosis Belirteçleri Arasındaki Korelasyon Analizleri

ELISA yöntemi ile değerlendirilen nötrofil kültür üst sıvıları NETosis belirteçleri ile serum NET belirteçleri arasındaki ilişkiler korelasyon analizi ile incelenmiştir. sitH3 ve PAD4 düzeyleri açısından kültür üst sıvısı ölçümleri ile serum ölçümleri arasında anlamlı ilişki görülmezken (tüm $p > 0,05$), serum MPO ve NE düzeylerinin hem normal dansiteli hem de düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvısı ölçümleri ile anlamlı ve pozitif yönde korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Korelasyon katsayılarının özellikle düşük dansiteli nötrofillerin PMA ve PSV-23 uyarımı sonrası elde edilen ölçümlerinde daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7. Nötrofil kültür üst sıvıları ve serum NETosis belirteçleri arasındaki korelasyon analizi

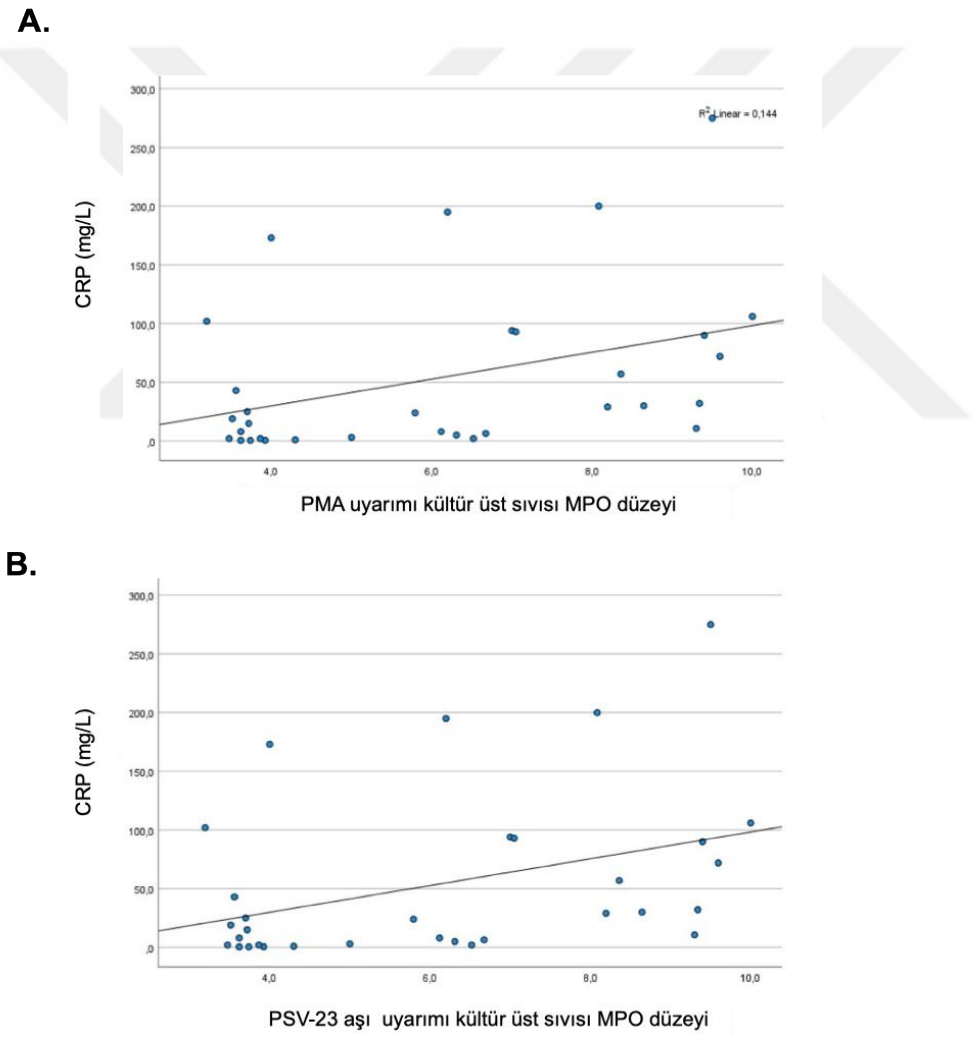
Serum	Kültür Üst Sıvı	r (Spearman)	p
sitH3	NOT-US	-0,096	0,600
	NOT-PMA	0,173	0,344
	NOT-PSV-23	0,235	0,195
	LDN-US	-0,048	0,794
	LDN-PMA	0,133	0,467
	LDN-PSV-23	0,153	0,402
MPO	NOT-US	0,439	**0,012**
	NOT-PMA	0,428	**0,014**
	NOT-PSV-23	0,545	**0,001**
	LDN-US	0,661	**< 0,001**
	LDN-PMA	0,708	**< 0,001**
	LDN-PSV-23	0,673	**< 0,001**
PAD4	NOT-US	-0,081	0,659
	NOT-PMA	-0,003	0,989
	NOT-PSV-23	0,242	0,181
	LDN-US	-0,007	0,969
	LDN-PMA	0,046	0,802
	LDN-PSV-23	0,126	0,492
NE	NOT-US	0,375	**0,034**
	NOT-PMA	0,436	**0,013**
	NOT-PSV-23	0,585	**< 0,001**
	LDN-US	0,478	**0,006**
	LDN-PMA	0,736	**< 0,001**
	LDN-PSV-23	0,719	**< 0,001**

(NOT: normal dansiteli nötrofil, LDN: düşük dansiteli nötrofil, US: stimülasyonsuz, PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, sitH3: sitrulinlenmiş histon H3, MPO:

miyeloperoksidaz, PAD4: peptidil arjininin deiminaz-4, NE: nötrofil elestaz, r: Spearman korelasyon katsayısı, p < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)

4.7.5. NETosis Belirteçleri ile Klinik ve Laboratuvar Parametreleri Arasındaki Korelasyon Analizleri

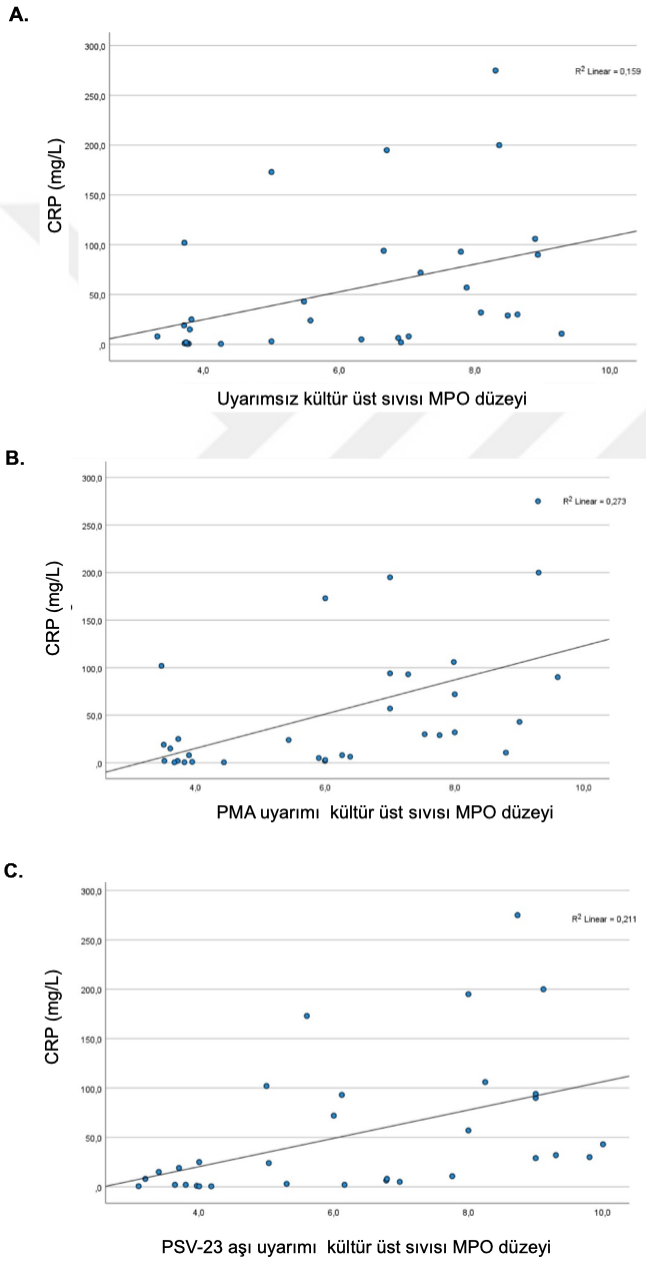
Sistemik inflamasyon göstergesi olarak CRP'nin kültür üst sıvılarında ELISA ile ölçülen çözünür NETosis parametreleri ile ilişkileri incelenmiştir. Tüm hasta grupları göz önüne alındığında CRP ile normal dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında PMA (r= 0,353, p = 0,047) ve PSV-23 aşısı (r= 0,379, p = 0,020) ile uyarılmış MPO düzeyleri arasında pozitif anlamlı korelasyon saptanmıştır (Şekil 25A ve 25B).



Şekil 25. CRP düzeyleri ile PMA ve PSV-23 uyarımlı normal dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki MPO düzeyleri arasındaki korelasyon

(CRP: C-reaktif protein, PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, MPO: miyeloperoksidaz)

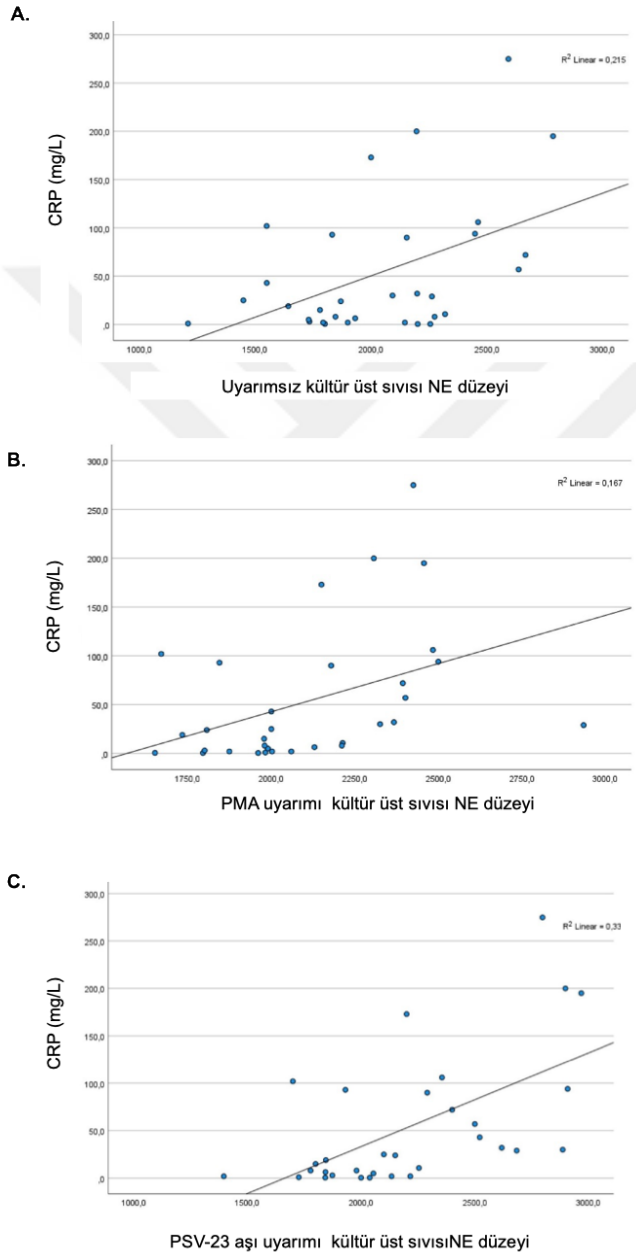
Tüm hasta grupları birlikte değerlendirildiğinde, CRP düzeyleri ile düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında stimülasyonsuz koşullarda (r= 0,398, p= 0,027), PMA uyarımı sonrası (r= 0,52, p= 0,002) ve PSV-23 aşı antijeni ile uyarım sonrası (r= 0,459, p= 0,002) ölçülen MPO düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil 26A, 26B ve 26C).



Şekil 26. CRP düzeyleri ile uyarımsız, PMA ve PSV-23 uyarımlı düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki MPO düzeyleri arasındaki korelasyon

(CRP: C-reaktif protein, PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, MPO: miyeloperoksidaz)

Hasta gruplarında serum CRP düzeyleri ile düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarında stimülasyonsuz koşullarda (r= 0,463, p=0,008), PMA uyarımı sonrası (r= 0,408, p= 0,002) ve PSV-23 aşı antijeni ile uyarım sonrası (r= 0,579, p < 0,001) ölçülen NE düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil 27A, 27B ve 27C).



Şekil 27. CRP düzeyleri ile uyarımsız, PMA ve PSV-23 uyarımlı düşük dansiteli nötrofil kültür üst sıvılarındaki NE düzeyleri arasındaki ilişki

(CRP: C-reaktif protein, PMA: forbol miristat asetat, PSV-23: 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı, NE: nötrofil elastaz)

Vasküler Behçet grubunda; Behçet hastalarında genel hastalık aktivitesini değerlendiren Behçet Hastalığı Güncel Aktivite Formu (BDCAF) ile NETosis belirteçleri arasında korelasyon tespit edilmedi.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda yeni tanı konulmuş, tedavi naif ve aktif vasküler tromboz ile başvuran Behçet hastalarında normal dansiteli ve düşük dansiteli nötrofil alt gruplarında nötrofil aktivasyonu ve NETosis yanıtı granülomatöz polianjitis, trombotik primer antifosfolipid sendromu ve idiyopatik vasküler tromboz grupları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, vasküler tutulumlu Behçet hastalığında nötrofil yanıtının hem otoimmün vaskülitlerden hem de trombozla seyreden hastalıklardan belirgin şekilde farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu farklılığın düşük dansiteli nötrofillerde çok daha net izlendiğinin gösterilmesi bu nötrofil alt grubunun Behçet hastalığı immünopatogenezinde önemli bir yere sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda vasküler Behçet hastalarında; hem normal hem düşük dansiteli nötrofillerde ROS üretimi ve NETosis belirteçlerinin arttığı; bu artışın özellikle düşük dansiteli nötrofillerde daha baskın olduğu görülmüştür. Behçet hastalığında nötrofillerin aktivasyon eşiğinin düşük olduğu ve uyarılara karşı daha güçlü yanıtlar verdiği çeşitli çalışma tasarımlarında ortaya konulmuştur [106, 107, 152]. Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda düşük dansiteli nötrofillerde uyarımsız koşullarda bile yüksek ROS üretimi saptanması, bu hücrelerin uyarıma bağlı kalmaksızın aktifleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca PMA ve 23 valanlı polisakkarid pnömokok aşısı (PSV-23) uyarımları sonrası aynı hücre grubunda yanıtın artması, vasküler tutulumlu Behçet hastalığında nötrofillerin hem uyarımsız koşulda hem de birbirinden farklı yapısal özelliklere sahip uyaranlar altında daha güçlü yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Literatürde Behçet hastalarında nötrofillerde ROS üretiminde artış, nitrik oksit serum düzeylerinde azalma gibi mekanizmalarla ortaya çıkan artmış oksidatif yanıtın endotel hücrelerinde yol açtığı değişikliklerin, hücre fonksiyonlarında bozulma ile ilişkili olabileceği bildirilmekle birlikte, bu sürecin patogenezdeki yeri ve rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [151, 157, 226]. Bizim bulgularımız vasküler Behçet hastalığında düşük dansiteli nötrofillerde klasik nötrofillerden çok daha belirgin bir nötrofil cevabı ve NETosis kapasitesinin bulunduğunu ortaya koyarak bu nötrofil alt grubunun hastalığın immünolojik gelişim sürecindeki yerine dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, Behçet hastalarında düşük dansiteli nötrofiller ile ilgili literatürde

sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Murad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Behçet hastalarında bu immün hücre alt grubunun artmış düzeylerde bulunduğu gösterilmiş; ayrıca PMA veya *E. coli* ile uyarımlar sonrasında NET oluşumunun belirgin şekilde arttığı, buna karşın reaktif oksijen ürünleri yanıtının azaldığı bildirilmiştir [65]. Bu bulgular NETosis açısından çalışmamızla örtüşmekle birlikte, ROS yanıtı açısından farklılık arz etmektedir. Bu farklılığın, çalışmamızda mukokutanöz karakterde, daha hafif seyir gösteren hastalar yerine vasküler tutuluma sahip daha ciddi seyirli Behçet hastalarının seçilmiş olması ve kullanılan uyarıcıların özellikleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın fark oluşturan yönlerinden biri, NETosis yanıtının değerlendirilmesinde 23-valanlı pnömokok polisakkarid aşı antijeninin, normal ve düşük dansiteli nötrofil aktivasyonunu uyarmak amacıyla kullanılmasıdır. Behçet hastalığında doğal immün sistemin artmış aktivitesini serumda yada doku düzeyinde yansıtabilecek kullanımda olan bir biyolojik gösterge bulunmamaktadır. Bu konudaki büyük eksikliğin klinikte yol açtığı belirsizlikleri giderebilmek adına İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Ahmet Gül öncülüğünde Dr. Rabia Deniz tarafından yürütülen araştırmada, PSV-23 kullanılarak yapılan deri paterji testinin klasik paterji uygulamasına göre duyarlılığının yüksek olduğu ve aktif Behçet hastalarının serum IL-1β yanıtını belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir [227]. Bizim çalışma bulgularımızda pnömokok polisakkarid aşı antijeni ile vasküler Behçet hastalarında ve özellikle düşük dansiteli nötrofil alt grubunda ROS üretimi ve NETosis belirteçlerinde artış gözlenmesi; bu deneysel sonuçların, doğal immün sistem hücrelerinin hastalığa özgü uyarılmış aşırı cevabını yansıtan önemli biyolojik göstergeler olabileceğini düşündürmektedir.

Behçet hastalarında periferik kan mononükleer hücrelerinde artan Toll benzeri reseptörlerin (TLR) çeşitli tiplerinin, *Streptococcus sanguinis* ve *Herpes simplex virüs tip 1* gibi mikroorganizmalara ait yapıları tanıyarak genetik olarak yatkın bireylerde doğal immün sistem hücrelerini aktive edebildiği bilinmektedir. Bu durumun mikrobiyal antijenler ile benzerlik gösteren konağın kendi protein yapılarına karşı gelişen çapraz immün yanıtlar sonucunda ortaya çıkabileceği düşünülmektedir [145, 228-230]. NETosis süreci de enfeksiyöz veya enfeksiyon dışı çok sayıda uyaran tarafından tetiklenebilmekte ve uyarıcının niteliğine bağlı olarak suisidal veya vital

yolaklar üzerinden gerçekleşebilmektedir [4, 6, 82, 85, 231]. Çalışmamızda pnömokok polisakkarit kapsül antijenini içeren aşı ile tetiklenen artmış NETosis yanıtı ve bu yanıtın düşük dansiteli nötrofillerde belirgin olması; Behçet hastalığında mikrobik etkenlere ait yapısal elemanlara doğal bağışıklık sisteminin gösterdiği artmış duyarlılığı desteklerken, nötrofillere ait hücresel alt gruplarının bu süreçteki önemine dikkat çekmektedir.

Pnömokok polisakkarit aşı antijen uyarımı sonrasında vasküler Behçet hastalarında düşük dansiteli nötrofillerde sitrülinlenmiş histon H3 (sitH3) ve sitH3 ve miyeloperoksidazı birlikte eksprese eden hücre oranlarının diğer hasta gruplarına kıyasla daha yüksek saptanması, bu nötrofil alt popülasyonunun mikrobiyal antijenik yapılara karşı artmış NETosis ile karşılık verdiğini düşündürmektedir. Bu veriler ışığında, vasküler Behçet hastalığında enfeksiyöz etkenlerin hastalığın ortaya çıkış süreci dışında, özellikle düşük dansiteli nötrofillerde uyarılma eşik limit değerini düşürerek, ROS üretimi ve NETosis yönüyle daha etkili nötrofil yanıtlarının ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu durumun tromboinflamatuvar sürece katkı sağlayacabileceği düşünülebilir. Bu bulgular, Behçette enfeksiyöz etkenlerin hastalık gelişimi ve hastalık bulgularının tetikleyicisi olabileceği yönündeki literatürü destekler niteliktedir [230, 232-234].

NET oluşumu sırasında ortaya çıkan dolaşımdaki hücresiz serbest DNA (cf-dsDNA), romatolojik hastalıklarda immünolojik süreçlerin anlaşılmasında önemli bir belirteç olmasının yanı sıra, bu mekanizmaları hedefleyen tedavi yaklaşımları açısından da potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir [235-238]. Bununla birlikte tek başına NETosis'e spesifik bir molekül olarak değerlendiremediğimiz cf-dsDNA'nın, diğer nötrofil ekstrasellüler tuzak ilişkili yapılar ile birlikte ölçülmesi ulaşılan sonuçların doğru değerlendirilmesi açısından son derece önemlidir [239]. Çalışmamızda cf-dsDNA düzeyleri serum ve nötrofil kültür üst sıvılarında beraber değerlendirildiğinde, bu belirtecin hastalık grupları arasındaki farklılıkları uyarımsız koşullardan ziyade farklı uyaranlara verilen yanıtlar üzerinden daha iyi yansıttığı görülmüştür. Buna paralel olarak plazma cf-dsDNA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiş olması, cf-dsDNA'nın tek başına NETosis'i ayırt edici olarak yansıtmayabileceğini, farklı hücresel ölüm mekanizmalarından ve farklı hücresel kaynaklardan oluşan DNA salınımından etkilenebildiği için tek başına

özgül bir gösterge olarak yeterli olmadığını bildiren literatür ile uyumludur [120, 240]. Nötrofil kültür üst sıvılarında ELISA ile yaptığımız ölçümler, cf-dsDNA seviyelerinin özellikle uyarı sonrası belirgin olarak arttığını göstermektedir. Vasküler trombozu olan Behçet hastalarında hem klasik farmakolojik bir uyaran olan PMA hem de mikrobiyal antijenik uyaran benzeri etki eden PSV-23 aşı uyarımı sonrası cf-dsDNA düzeylerinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olması NETosis'in Behçet hastalığında temelde yüksek etkinlik göstermesinden daha çok, uygun uyarılarla belirginleşen bir yanıt verdiğini göstermektedir.

Vasküler Behçet hastalarında düşük dansiteli nötrofillerde hem uyarımsız koşullarda hem de farklı stimülan ajanlar sonrası gözlemlediğimiz belirgin cf-dsDNA yanıtı, bu hücre alt grubunun NET oluşturma kapasitesindeki artış eğilimini desteklemektedir. Granülomatöz polianjitis, trombotik primer antifosfolipid sendromu ve idiyopatik vasküler tromboz grupları ile karşılaştırıldığında vasküler Behçet hastalarında daha belirgin cf-dsDNA yanıtı izlenmesi düşük dansiteli nötrofillerin Behçet hastalığında abartılı ve kolay uyarılabilir doğal immün yanıtın başlıca hücresel bileşenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; literatürde önemli bir yere sahip olan Le Joncour ve ark. yaptıkları çalışmada ortaya koydukları vasküler Behçet hastalarında daha belirgin olmak üzere Behçette aktif hastalık dönemlerinde NET ile ilişkili DNA yapılarının (cf-dsDNA ve MPO-bağlantılı DNA oluşumları) arttığını gösteren verileri destekler niteliktedir. Yine aynı çalışmada Behçet hastalarına ait nötrofillerin herhangi bir ek uyarı olmadan NET benzeri yapı oluşturma eğiliminin belirginleştiği NET yıkımının sağlanmasıyla trombin üretiminde gerileme görüldüğü bildirilmiştir [107]. Bizim çalışma bulgularımız, bu sonuçların ötesine geçerek; özellikle düşük dansiteli nötrofiller üzerinden nötrofil heterojenitesinin, vasküler tutulumlu Behçet hastalığındaki yerini ve NETosis açısından önemini ortaya koymuştur. Bu yönde elde ettiğimiz veriler düşük dansiteli nötrofillerin hastalık gelişimindeki inflamatuvar süreçlerde kritik bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz serum örnekleri ile nötrofil kültür üst sıvılarında NETosis belirteçleri birlikte değerlendirildiğinde vasküler Behçet hastalığında hem serumda sistemik NET yükünün hem de nötrofillerin indüklenebilir NETosis potansiyelinin arttığı görülmektedir. Serumda sitH3, MPO ve NE düzeylerinin yüksek saptanması *in*

vivo nötrofil aktivasyonunu desteklerken, özellikle PSV-23 uyarımı sonrası düşük dansiteli nötrofillerde gözlenen artmış NETosis yanıtı, bu hücresel alt grubun vasküler Behçet hastalığında daha aktif bir etkinliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir. Serum ve kültür üst sıvı sonuçları arasındaki farklılıklar ölçümlerin NETosis sürecinin farklı basamaklarını yansıtması ile izah edilebilir. Serum belirteçleri dolaşımdaki toplam NET hacmini ve sistemik inflamasyonu temsil ederken nötrofil kültür üst sıvılarının sonuçları nötrofillerin birbirinden farklı yapıdaki uyaranlara karşı fonksiyonel etkinliğini göstermektedir [96, 97, 241, 242].

Bu değerlendirmelerle uyumlu olarak, MPO ve NE düzeylerinin serum ve nötrofil kültür üst sıvı ölçümleri arasında anlamlı korelasyon göstermesi, bu belirteçlerin sistemik NET yükünü daha iyi yansıttığını ve azurofilik granül içeriklerinin hücre dışı ortama kolayca salınabildiğini düşündürmektedir. Buna karşılık sitrülinlenmiş histon H3 ve PAD4 NET oluşum sürecinin daha çok hücre içi nukleusta gerçekleşen basamaklarını yansıtırken, dolaşımda ölçülen seviyeleri de farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca güncel çalışmalar, sitrülinlenme ve PAD4 aktivasyonu olmaksızın da farklı NET oluşum yollarının olabileceğini göstermektedir [88, 95, 243-245]. Özellikle düşük dansiteli nötrofil kaynaklı MPO ve NE seviyeleri ile CRP arasında saptanan pozitif korelasyon nötrofillere ait bu immün hücre alt grubununun NETosis cevabı ile sistemik inflamatuvar yanıt arasındaki ilişkiyi destekler bir bulgu olarak görünmektedir.

Elde ettiğimiz deneysel sonuçlarda vasküler Behçet hastalarında artmış NETosis ve düşük dansiteli nötrofil cevabı gözlenirken; Behçet'te genel hastalık aktivitesini yansıtan Behçet Hastalığı Güncel Aktivite Formu (BDCAF) ile değerlendirilen hastalık aktivitesi ile NETosis belirteçleri arasında korelasyon izlenmemiştir. Bunun Behçet hastalığında kullanılan aktivite skorlarının majör organ ve sistem tutulumlarını, klinik tablodaki önemine göre yeterince yansıtmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Hastalık fenotipini belirleyen vasküler tutulum gibi özellikli durumlar, BDCAF skorlamasına göre var olup olmamasına göre değerlendirildiğinden, vasküler tutulumun ağırlığı ve hastalık seyrine etkisi yeterince ortaya konulamamaktadır [246]

Düşük dansiteli nötrofillerin heterojen yapılanma gösteren, aktivitesi ve inflamatuvar potansiyeli yüksek hücreler olduğu bilinmektedir [55, 105]. Çalışmamızda apoptotik indeksin normal ve düşük dansiteli nötrofillerde kültür sonrası çeşitli uyaranlar altında değerlendirilmesi ile gözlenen artmış apoptoz yanıtının bu hücrelerin

uyarımsız şartlardaki yaşam sürelerinden ziyade farklı uyarım koşulları sonrası gelişen hücresel yanıtı gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda vasküler Behçet hastalarına vaskülit kontrol grubu olarak aktif, yeni tanı, tedavi naif granülomatöz polianjitis hastalarının seçilmesi önemli bir gözlemsel avantaj sağlamıştır. Çünkü bu sayede Behçette gözlenen nötrofil aktivasyonu ve NETosis yanıtlarının salt vaskülitik inflamasyonun bir sonucu olup olmadığı değerlendirilebilmiştir. MPO ve proteinaz-3 gibi nötrofil primer granül içeriklerine karşı gelişen anti nötrofil sitoplazmik antikorların (ANCA) nötrofil aktivasyonu, granül içeriklerinin salınımı ve nötrofil ekstrasellüler tuzak (NET) yapılarının oluşumunu uyarabildiği bilinmektedir [7, 198]. Elde edilen verilerde granülomatöz polianjitis hastalarında özellikle düşük dansiteli nötrofillerde bazı NETosis belirteçlerinde artış gözlenmekle birlikte bu artışın Behçet hastalarındaki kadar belirgin olmadığı saptanmıştır. Vasküler Behçetteki NETosis yanıtı ve düşük dansiteli nötrofil aşırı yanıtının, granülomatöz polianjitis'te görülenden daha belirgin olması vaskülit zemini olan iki ayrı hastalıkta NETosis yanıtlarının aynı olmadığını ortaya koymaktadır.

Literatürde aktif ANCA ilişkili vaskülit hastalarında serumda NET düzeylerinin arttığını ve bunların hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. NET'lerin ANCA oluşumunu uyarabildiği ve bu inflamatuvar süreci destekleyebildikleri düşünülmektedir [5, 90]. Ayrıca AAV'de düşük dansiteli nötrofillerin varlığı ve bu hücrelerin hastalığa özgü nötrofil aktivasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [203]. Ancak bu konudaki çalışmalarda benzer sonuçlar göstermemektedir. Bir çalışmada AAV hastalık aktivitesi ile dolaşan NET düzeyleri arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir [204]. Bir başka çalışmada da AAV hastalarında görülen düşük dansiteli nötrofillerin farklı bir hücre grubunu temsil etmeyip bu hastalarda grünolopoez ihtiyacının artmasına yanıt olarak ortaya çıkan olgunlaşma sürecini tamamlamamış bir nötrofil grubunu yansıttığı görüşü savunulmuştur [205].

Çalışmamızda granülomatöz polianjitis grubunda gözlenen daha sınırlı NETosis yanıtı, ANCA ilişkili vaskülitlerde nötrofil aktivasyonunun vasküler Behçet hastalığından farklı mekanizmalarla oluşabileceğini düşündürmektedir. PMA NADPH oksidaz aracılı ROS bağımlı suisidal NETosis'i ortaya koymak için *in vitro* şartlarda yaygın olarak kullanılan bir kimyasal uyarandır. Ancak AAV'de nötrofil aktivasyonunun daha çok ANCA aracılı sinyal yolakları, Fcγ reseptörleri, kompleman

yolakları ve vasküler endotel ile olan etkileşimler aracılığıyla geliştiği düşünülmektedir. Bu nedenle PMA ile indüklenen NETosis yanıtının, AAV'de immün kompleksler ve ANCA aracılı gelişen immün süreçleri tümüyle yansıtmayabileği bildirilmektedir [195, 199]. Buna karşılık vasküler Behçet hastalığında hem klasik kimyasal uyarı oluşturan PMA'ya hem de mikrobiyal antijenik uyaranı taklit eden PSV-23'e karşı, normal ve düşük dansiteli nötrofillerde daha belirgin yanıt gözlenmesi dikkat çekicidir.

Ayrıca çalışmamızda vasküler trombotik Behçet hastalarının trombotik primer antifosfolipid sendromu ve idiyopatik vasküler tromboz hasta grupları ile mukayesesi önem arz etmektedir. Çünkü vasküler Behçet hastalığında saptanan farklılık yalnızca tromboz gelişim sürecine bağlı olarak ortaya çıkmış olsaydı, trombotik primer antifosfolipid sendromu veya idiopatik vasküler tromboz gruplarında da benzer derecede ROS üretiminde, NETosis belirteçlerinde ve cf-dsDNA üretiminde artış olması beklenebilirdi. Buna karşın bizim verilerimizde vasküler trombotik primer antifosfolipid sendromu hastalarında, vasküler Behçet ve idiyopatik vasküler tromboz gruplarına kıyasla NETosis'in baskın olmadığı görülmektedir.

Literatürde antifosfolipid sendromu patogenezinde NETosis'in yerine işaret eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin Mancuso ve ark. çalışmasında antifosfolipid antikorlarının, özellikle β2 glikoprotein domain I'e karşı gelişen antikorların, nötrofilleri aktive ederek NET salınımını tetikleyebildiği gösterilmiştir [247]. Yine Mazetto ve ark.'nın çalışmasında antifosfolipid sendromunda, yüksek riskli antifosfolipid antikor profiline sahip ve birden fazla tromboz atağı olan hastalarda NET oluşumunun daha belirgin olduğu gösterilmiştir [248]. Benzer şekilde bir başka çalışmada trombotik antifosfolipid sendromunun erken döneminde NETosis belirteçlerinin ölçülmesinin önemine dikkat çekilmiştir [249]. Dolaylı olarak NET'lerin farmakolojik olarak hedeflenmesine yönelik hayvan deneylerinde, antifosfolipid sendromu hastalarında antifosfolipid antikorlara bağlı gelişen tromboz ve NETosis süreçleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu konuda Ali ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda dipiridamolün NETosis'i baskılayarak, venöz trombozu azalttığı, benzer şekilde zencefil türevi ile NET düzeylerinde azalma sağlanmasının tromboz yükü ve otoantikor üretiminde azalma sağladığı gösterilmiştir [224, 250]. Ayrıca inme, derin ven trombozu gibi trombotik olaylarda NET'lerin ve düşük dansiteli nötrofillerin önemine dikkat çeken çalışmalar bulunmaktadır [165, 166]. Bizim bulgularımızda vasküler

trombotik primer antifosfolipid sendromu hastalarında, literatürde NETosis'in antifosfolipid sendromu ve tromboz patogenezinde önemine dikkat çeken çalışmalara rağmen; vasküler Behçet ve idiyopatik vasküler tromboz gruplarına kıyasla baskın bir NETosis yanıtı izlenmemiştir. Bu durum, primer antifosfolipid sendromunda NETosis'in hastalık patogenezindeki yerini dışlamaktan öte, NETosis'i tetikleyen immün mekanizmaların, nötrofillerin aktivasyon derecelerinin ve nötrofillerin farklı uyaranlara verdikleri yanıtları hastalık grupları arasında farklılık gösterebileceğini desteklemektedir. Avusturya'da Mauracher ve ark. çalışmasında antifosfolipid sendromunda özellikle düşük dansiteli nötrofillerde bazal düzeyde artmış aktivasyon ve NET oluşumu bildirilmiştir [251]. Bizim verilerimizde düşük dansiteli nötrofillerde uyarı sonrası PAD4 düzeylerinde artış görülmesine rağmen, bu yanıta diğer NETosis belirteçlerinde belirgin bir artışın eşlik etmemesi, PAD4 aktivasyonuna bağlı histonların sitrülinlenmesi ardından kromatin yapısındaki gevşemenin tek başına suisidal NETosis yanıtının bütünüyle ortaya çıkması için yeterli olmadığını düşündürmektedir. Bu durum antifosfolipid sendromunda nötrofillerin uyarımsız şartlarda limitli, uyaranlara maruz kaldığında da anlamlı düzeyde yükselmiş yanıt göstermeyen bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Neticede vasküler trombotik Behçet hastalığında belirgin olan düşük uyarılma eşikli ve belirgin artmış NETosis yanıtından ziyade, trombotik primer antifosfolipid sendromunda nötrofil yanıtının daha düşük ve hastalar arasında daha heterojen vasıfta olduğu kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızın bazı kısıtlı yönleri bulunmaktadır. Çalışmaya dahil edilen hastalık gruplarında hasta sayılarının sınırlı olması, elde edilen bulguların daha geniş hasta gruplarında genellenebilirliğini kısıtlayabilir. Tüm gruplarda hastaların aktif hastalık döneminde olmasından dolayı aktif ve inaktif hastalık dönemlerine ait nötrofil aktiviteleri mukayese edilememiştir. NETosis değerlendirmesi akan hücre ölçer analizleri ile serum ve nötrofil kültür üst sıvı incelemeleri üzerinden gerçekleştirilmiş olmakla birlikte, NET oluşumuna ait moleküler sinyal mekanizmaları ve doku düzeyindeki olaylar değerlendirilememiştir. Ayrıca NET yıkımı ile ilgili süreçler inceleneme kapsamına alınamamıştır.

6.SONUÇ

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular vasküler tutulumlu Behçet hastalığında nötrofil aktivasyonu ve NETosis yanıtının hem otoimmün vaskülitlerden hem de trombotik hastalıklardan farklı olduğunu ve düşük dansiteli nötrofiller düzeyinde bu farklılığın daha belirgin olduğunu göstermektedir. Bulgularımız, vasküler trombotik Behçet hastalığında trombozun yalnızca koagülasyon kaskadı üzerinden açıklanamayacağını, artmış ROS üretimi, kolay uyarılma eşik değerine sahip NETosis cevabı ve uyarıma tabi olmaksızın önceden aktive olmuş düşük dansiteli nötrofil hücre grubu ile karakterize farklı bir sürecin rol oynadığını düşündürmektedir. 23 valanlı pnömokok polisakkarid aşı (PSV-23) antijenik uyarımı ile ortaya çıkan yanıtın bu farklılığı daha görünür hale getirmesi, Behçet hastalığında doğal immün sistemin uyarılara karşı artmış cevabının normal ve düşük dansiteli nötrofil alt grupları açısından gösterilebileceğini desteklemektedir. Bu nedenle özellikle uyarılmış düşük dansiteli nötrofil kaynaklı NETosis belirteçleri, ROS düzeyleri, hücresiz cf-dsDNA ölçümleri vasküler Behçet hastalığının patogenezini aydınlatmanın yanısıra gelecekte tanı, hastalık fenotip ayrımı, aktivite tayini ve tedavi süreçlerinde kullanım alanı bulabilecek önemli birer biyolojik gösterge olarak karşımıza çıkma potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Oh, S.-A., et al., *Platelet-derived HMGB1 induces NETosis, exacerbating brain damage in the photothrombotic stroke model.* Mol Med, 2025. **31**(1): p. 46.
2. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-489.
3. Thiam, H.R., et al., *Cellular mechanisms of NETosis.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2020. **36**(1): p. 191-218.
4. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-2794.
5. Söderberg, D., et al., *Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission.* Rheumatology, 2015. **54**(11): p. 2085-2094.
6. Vorobjeva, N. and B. Chernyak, *NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology.* Biochemistry (Mosc.), 2020. **85**(10): p. 1178-1190.
7. Tang, R., et al., *NETs: A new target for autoimmune disease.* Front Immunol, 2025. **16**: p. 1646527.
8. Olsson, A.-K. and J. Cedervall, *NETosis in cancer–platelet–neutrophil crosstalk promotes tumor-associated pathology.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 373.
9. Teijeira, Á., et al., *CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity.* Immunity, 2020. **52**(5): p. 856-871. e8.
10. Bonneau, S., et al., *Correlation between neutrophil extracellular traps (NETs) expression and primary graft dysfunction following human lung transplantation.* Cells, 2022. **11**(21): p. 3420.
11. Guillotin, F., et al., *Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia.* Front Cell Dev Biol, 2023. **10**: p. 1099038.
12. Perdomo, J., et al., *Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1322.
13. Chen, Z., et al., *Ginsenoside Rg5 allosterically interacts with P2RY12 and ameliorates deep venous thrombosis by counteracting neutrophil NETosis and inflammatory response.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 918476.
14. Kessenbrock, K., et al., *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis.* Nat Med, 2009. **15**(6): p. 623-625.
15. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease.* Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.
16. Van Bruggen, S. and K. Martinod, *The coming of age of neutrophil extracellular traps in thrombosis: Where are we now and where are we headed?* Immunol Rev, 2023. **314**(1): p. 376-398.
17. Saliakhutdinova, S.M., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Promote Platelet-Driven Contraction of Inflammatory Blood Clots via Local Generation of Endogenous Thrombin and Softening of the Fibrin Network.* Cells, 2025. **14**(24): p. 2018.
18. Liu, Q., et al., *The role of platelet–neutrophil interactions in driving autoimmune diseases.* Immunology, 2025. **175**(1): p. 1-15.

19. Behzadifard, M. and M. Soleimani, *NETosis and SARS-COV-2 infection related thrombosis: a narrative review.* Thromb J, 2022. **20**(1): p. 1-6.
20. Wagner, D.D. and L.A. Heger, *Thromboinflammation: from atherosclerosis to COVID-19.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(9): p. 1103-1112.
21. Tong, B., et al., *Immunopathogenesis of Behcet's disease.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 665.
22. Kapsimali, V.D., et al., *Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasison the role of immunological aberrations.* Clin Rheumatol, 2010. **29**(11): p. 1211-1216.
23. Davatchi, F., et al., *Behcet's disease: epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis.* Expert Rev Clin Immunol, 2017. **13**(1): p. 57-65.
24. Gül, A. *Pathogenesis of Behçet's disease: autoinflammatory features and beyond*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(4): p. 413-418.
25. Disease, I.T.f.t.R.o.t.I.C.f.B.s., et al., *The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014. **28**(3): p. 338-347.
26. Davatchi, F., et al., *Diagnostic value of pathergy test in Behcet's disease according to the change of incidence over the time.* Clin Rheumatol, 2011. **30**(9): p. 1151-1155.
27. Ganesh, K. and M.B. Joshi, *Neutrophil sub-types in maintaining immune homeostasis during steady state, infections and sterile inflammation.* Inflamm Res, 2023. **72**(6): p. 1175-1192.
28. Herro, R. and H.L. Grimes, *The diverse roles of neutrophils from protection to pathogenesis.* Nat Immunol, 2024. **25**(12): p. 2209-2219.
29. Liew, P.X. and P. Kubes, *The neutrophil's role during health and disease.* Physiol Rev, 2019. **99**(2): p. 1223-1248.
30. Grieshaber-Bouyer, R. and P.A. Nigrovic, *Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 346.
31. Kobayashi, S.D., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Influence of microbes on neutrophil life and death.* Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 159.
32. Ballesteros, I. and A. Hidalgo, *The neutrophil collective.* Cell, 2025. **188**(25): p. 7019-7035.
33. Lehman, H.K. and B.H. Segal, *The role of neutrophils in host defense and disease.* J Allergy Clin Immunol, 2020. **145**(6): p. 1535-1544.
34. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-175.
35. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-1327.
36. Aroca-Crevillén, A., et al., *Neutrophils in physiology and pathology.* Annu Rev Pathol, 2024. **19**(1): p. 227-259.
37. Burn, G.L., et al., *The neutrophil.* Immunity, 2021. **54**(7): p. 1377-1391.
38. Tecchio, C., A. Micheletti, and M. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression.* Front Immunol, 2014. **5**: 508.
39. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-531.
40. Kim, H.K., et al., *G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells.* Blood, 2006. **108**(3): p. 812-820.

41. Zarbock, A. and K. Ley, *Neutrophil adhesion and activation under flow.* Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 31-42.
42. Maier-Begandt, D., et al., *Neutrophils—biology and diversity.* Nephrol Dial Transplant, 2024. **39**(10): p. 1551-1564.
43. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1307-1315.
44. Schmidt, E.P., et al., *On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity.* Physiology, 2011. **26**(5): p. 334-347.
45. van Eeden, S.F., et al., *The use of flow cytometry to measure neutrophil function.* J Immunol Methods, 1999. **232**(1-2): p. 23-43.
46. Wigerblad, G. and M.J. Kaplan, *Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases.* Nat Rev Immunol, 2023. **23**(5): p. 274-288.
47. Xie, X., et al., *Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection.* Nat Immunol, 2020. **21**(9): p. 1119-1133.
48. Tsai, C.-Y., et al., *Cross-talk among polymorphonuclear neutrophils, immune, and non-immune cells via released cytokines, granule proteins, microvesicles, and neutrophil extracellular trap formation: a novel concept of biology and pathobiology for neutrophils.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(6): p. 3119.
49. Denny, M.F., et al., *A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs.* J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3284-3297.
50. Silvestre-Roig, C., et al., *Neutrophil diversity in health and disease.* Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 565-583.
51. Hassani, M., et al., *On the origin of low-density neutrophils.* J Leukoc Biol, 2020. **107**(5): p. 809-818.
52. Fu, Y., Z. Wen, and J. Fan, *Interaction of low-density neutrophils with other immune cells in the mechanism of inflammation.* Mol Med, 2025. **31**(1): p. 133.
53. Blanco-Camarillo, C. and C. Rosales, *Low-Density Neutrophils: Enigmatic Cells in Health and Disease.* J Immunol Res, 2025. **2025**(1): p. 3037744.
54. Hsu, B.E., et al., *Immature low-density neutrophils exhibit metabolic flexibility that facilitates breast cancer liver metastasis.* Cell Rep, 2019. **27**(13): p. 3902-3915. e6.
55. Blanco-Camarillo, C., O.R. Alemán, and C. Rosales, *Low-density neutrophils in healthy individuals display a mature primed phenotype.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 672520.
56. Seman, B.G. and C.M. Robinson, *The enigma of low-density granulocytes in humans: complexities in the characterization and function of LDGs during disease.* Pathogens, 2021. **10**(9): p. 1091.
57. Nutley, A.S., N. Pisacano, and M. Prendecki, *Low-density granulocytes in the pathogenesis of inflammatory disease.* J Leukoc Biol, 2025. **117**(11): p. qiaf133.
58. Pei, S., et al., *Anti-CitH3 IgG: new antibodies highly correlated with anti-NETs antibodies and thrombosis in antiphospholipid syndrome.* J Thromb Haemost, 2025. **23**(10): 3295-3306.
59. Cho, Y., et al., *Neutrophil extracellular traps contribute to liver damage and increase defective low-density neutrophils in alcohol-associated hepatitis.* J Hepatol, 2023. **78**(1): p. 28-44.

60. Cohen, T.S., et al., *Staphylococcus aureus drives expansion of low-density neutrophils in diabetic mice.* J Clin Invest, 2019. **129**(5): p. 2133-2144.
61. Yiu, J.Y., et al., *Increased levels of low density neutrophils (LDNs) in myocardial infarction.* Acta Cardiol, 2023. **78**(1): p. 47-54.
62. Valadez-Cosmes, P., et al., *Identification of novel low-density neutrophil markers through unbiased high-dimensional flow cytometry screening in non-small cell lung cancer patients.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 703846.
63. Mistry, P., et al., *Transcriptomic, epigenetic, and functional analyses implicate neutrophil diversity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2019. **116**(50): p. 25222-25228.
64. Lipka, S., et al., *Increased levels of immature and activated low density granulocytes and altered degradation of neutrophil extracellular traps in granulomatosis with polyangiitis.* Plos one, 2023. **18**(3): p. e0282919.
65. Murad, M., et al., *Low density neutrophils are increased in patients with Behçet's disease but do not explain differences in neutrophil function.* J Inflamm (Lond.), 2022. **19**(1): p. 5.
66. Carlucci, P.M., et al., *Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus.* JCI insight, 2018. **3**(8): p. e99276.
67. Lande, R., et al., *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA–peptide complexes in systemic lupus erythematosus.* Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra19-73ra19.
68. Molinaro, R., et al., *Targeted delivery of protein arginine deiminase-4 inhibitors to limit arterial intimal NETosis and preserve endothelial integrity.* Cardiovasc Res, 2021. **117**(13): p. 2652-2663.
69. Dejas, L., et al. *Regulated cell death in neutrophils: From apoptosis to NETosis and pyroptosis*. Semin Immunol, 2023. **70**: 101849.
70. Nakabo, S., M.J. Kaplan, and S. Gupta, *Quantification of neutrophils undergoing NET formation and distinguishing mechanisms of neutrophil cell death by use of a high-throughput method*. Methods Mol Biol, 2022. 2543: p. 129-140.
71. Tu, H., et al., *Dying to defend: neutrophil death pathways and their implications in immunity.* Adv Sci (Weinh), 2024. **11**(8): p. 2306457.
72. Wang, X., S. Yousefi, and H.-U. Simon, *Necroptosis and neutrophil-associated disorders.* Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 111.
73. Zeng, W., et al., *Ferroptotic neutrophils induce immunosuppression and chemoresistance in breast cancer.* Cancer Res, 2025. **85**(3): p. 477-496.
74. Li, P., et al., *Glutathione peroxidase 4–regulated neutrophil ferroptosis induces systemic autoimmunity.* Nat Immunol, 2021. **22**(9): p. 1107-1117.
75. Lee, K.H., et al., *Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: a comprehensive review.* Autoimmunity Rev, 2017. **16**(11): p. 1160-1173.
76. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-1535.
77. Frangou, E., et al., *An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): Implications for the pathogenesis and treatment.* Autoimmunity Rev, 2019. **18**(8): p. 751-760.
78. Misra, D.P., et al., *Mechanisms of thrombosis in ANCA-associated vasculitis.* Clin Rheumatol, 2021. **40**(12): p. 4807-4815.

79. Mutua, V. and L.J. Gershwin, *A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics.* Clin Rev Allergy Immunol, 2021. **61**(2): p. 194-211.
80. Khandpur, R., et al., *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.* Sci Transl Med, 2013. **5**(178): p. 178ra40-178ra40.
81. Yang, F., et al., *Programmed cell death pathways in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Immunol Res, 2019. **2019**(1): p. 3638562.
82. Wang, Y., et al., *Composition and function of neutrophil extracellular traps.* Biomolecules, 2024. **14**(4): p. 416.
83. Dömer, D., et al., *Neutrophil extracellular traps activate proinflammatory functions of human neutrophils.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 636954.
84. Bečka, E., L. Hudecová, and M. Pastorek, *Mitochondria as Inducers of Neutrophil Extracellular Traps.* Inflammation, 2026. **49**(1): 67.
85. Chen, T., et al., *Receptor-mediated NETosis on neutrophils.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 775267.
86. Cahilog, Z., et al., *The role of neutrophil NETosis in organ injury: novel inflammatory cell death mechanisms.* Inflammation, 2020. **43**(6): p. 2021-2032.
87. Liu, X., et al., *PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease.* J Thromb Haemost, 2021. **19**(7): p. 1607-1617.
88. Metzler, K.D., et al., *A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis.* Cell Rep, 2014. **8**(3): p. 883-896.
89. Fu, Y., et al., *Neutrophil and neutrophil extracellular traps in acute kidney injury: from mechanisms to treatments.* Front Immunol, 2025. **16**: p. 1688207.
90. Kusunoki, Y., et al., *Peptidylarginine deiminase inhibitor suppresses neutrophil extracellular trap formation and MPO-ANCA production.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 227.
91. Azzouz, D. and N. Palaniyar, *How do ROS induce NETosis? Oxidative DNA damage, DNA repair, and chromatin decondensation.* Biomolecules, 2024. **14**(10): p. 1307.
92. van Dam, L.S., et al., *Intrinsically distinct role of neutrophil extracellular trap formation in antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis compared to systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheumatol, 2019. **71**(12): p. 2047-2058.
93. Yang, H., et al., *New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 302.
94. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease.* Nat Med, 2016. **22**(2): p. 146-153.
95. Li, X., et al., *Role and therapeutic targeting strategies of neutrophil extracellular traps in inflammation.* Int J Nanomedicine, 2023. **18**: p. 5265-5287.
96. Stoimenou, M., et al., *Methods for the assessment of NET formation: from neutrophil biology to translational research.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(24): p. 15823.
97. Masuda, S., et al., *Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry.* Cytometry A, 2017. **91**(8): p. 822-829.

98. Brinkmann, V., et al., *Automatic quantification of in vitro NET formation.* Front Immunol, 2013. **3**: p. 413.
99. Carmona-Rivera, C. and M.J. Kaplan, *Induction and quantification of NETosis.* Curr Protoc Immunol, 2016. **115**(1): p. 14.41. 1-14.41. 14.
100. Thålin, C., et al., *Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma.* Immunol Res, 2017. **65**(3): p. 706-712.
101. Zharkova, O., et al., *A flow cytometry-based assay for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps in mixed cell populations.* Cytometry Part A, 2019. **95**(3): p. 268-278.
102. Rinaldi, G., et al., *Simplified flow cytometric quantification of human neutrophil extracellular traps (NETs).* J Inflamm (Lond.), 2026. **23**(1): 6.
103. Wang, W., et al., *Neutrophil extracellular traps in autoimmune diseases: analysis of the knowledge map.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1095421.
104. Giaglis, S., S. Hahn, and P. Hasler, *"The NET Outcome": are Neutrophil Extracellular Traps of any relevance to the pathophysiology of autoimmune disorders in childhood?* Frontiers Pediatr, 2016. **4**: p. 97.
105. Carmona-Rivera, C. and M.J. Kaplan, *Low-density granulocytes in systemic autoimmunity and autoinflammation.* Immunol Rev, 2023. **314**(1): p. 313-325.
106. Li, L., et al., *Neutrophil extracellular traps promote aberrant macrophages activation in Behçet's disease.* Front Immunol, 2021. **11**: p. 590622.
107. Le Joncour, A., et al., *Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behcet's disease.* Ann Rheum Dis, 2019. **78**(9): p. 1274-1282.
108. Tsourouktsoglou, T.-D., et al., *Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4.* Cell Rep, 2020. **31**(5): p. 107602.
109. Garcia-Romo, G.S., et al., *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus.* Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra20-73ra20.
110. Hashimoto, T., et al., *Cell-free DNA in rheumatoid arthritis.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(16): p. 8941.
111. Duvvuri, B. and C. Lood, *Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 502.
112. Xu, Y., et al., *High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE.* Eur J Clin Invest, 2018. **48**(11): p. e13015.
113. Peng, Y., et al., *Circulating cell-free DNA correlate to disease activity and treatment response of patients with radiographic axial spondyloarthritis.* Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 178.
114. Guliyeva, V., et al., *NETs in the spotlight: exploring NETosis markers for tracking disease activity in IgA vasculitis.* Rheumatology, 2025. **64**(10): p. 5509-5517.
115. Tug, S., et al., *Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients.* Cell Immunol, 2014. **292**(1-2): p. 32-39.
116. Hamfjord, J., et al., *Total circulating cell-free DNA as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer before first-line oxaliplatin-based chemotherapy.* Ann Oncol, 2019. **30**(7): p. 1088-1095.

117. Lin, A.Y., et al., *CfDNA-based copy-number dynamics during anti-PD1 treatment in metastatic triple negative breast cancer.* Cell Rep Med, 2025. **6**(12): 102512.
118. Akifova, A., et al., *Donor-derived cell-free DNA monitoring for early diagnosis of antibody-mediated rejection after kidney transplantation: a randomized trial.* Nephrol Dial Transplant, 2025. **40**(7): p. 1384-1395.
119. Yu, H., et al., *Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 7571-7582.
120. Goggs, R., et al., *Neutrophil-extracellular traps, cell-free DNA, and immunothrombosis in companion animals: a review.* Vet Pathol, 2020. **57**(1): p. 6-23.
121. Schauer, C., et al., *Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines.* Nat Med, 2014. **20**(5): p. 511-517.
122. Gul, A., *Behçet's disease as an autoinflammatory disorder.* Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(1): p. 81-83.
123. Saadoun, D. and B. Wechsler, *Behçet's disease.* Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**(1): 20.
124. Nieto, I.G. and J.L.C. Alabau, *Immunopathogenesis of behçet disease.* Curr Rheumatol Rev, 2020. **16**(1): p. 12-20.
125. Saadoun, D., B. Bodaghi, and P. Cacoub, *Behçet's syndrome.* N Engl J Med, 2024. **390**(7): p. 640-651.
126. Grzybowski, A., et al., *Adamantiades-Behçet disease: Between dermatology and ophthalmology.* Clin Dermatol, 2023. **41**(4): p. 469-475.
127. Al-Obeidi, A.F. and J. Nowatzky, *Immunopathogenesis of Behçet's disease.* Clin Immunol, 2023. **253**: p. 109661.
128. Calamia, K.T., M. Schirmer, and M. Melikoglu, *Major vessel involvement in Behçet disease.* Curr Opin Rheumatol, 2005. **17**(1): p. 1-8.
129. Emmi, G., et al., *Vascular Behçet's syndrome: an update.* Intern Emerg Med, 2019. **14**: p. 645-652.
130. Bettiol, A., et al., *Vascular Behçet syndrome: from pathogenesis to treatment.* Nat Rev Rheumatol, 2023. **19**(2): p. 111-126.
131. Gul, A. and S. Ohno, *HLA-B* 51 and Behçet disease.* Ocul Immunol Inflamm, 2012. **20**(1): p. 37-43.
132. Khoshbakht, S., et al., *Behçet's disease: a comprehensive review on the role of HLA-B* 51, antigen presentation, and inflammatory cascade.* Int J Mol Sci, 2023. **24**(22): p. 16382.
133. Kirino, Y., M. Takeuchi, and A. Gül, *Immunogenetics of Behçet's disease: Is there a link to recent phenotypic changes?* Saudi J Ophthalmol, 2025. **39**(4): p. 323-328.
134. Kuiper, J.J., et al., *EULAR study group on 'MHC-I-opathy': identifying disease-overarching mechanisms across disciplines and borders.* Ann Rheum Dis, 2023. **82**(7): p. 887-896.
135. Remmers, E.F., et al., *Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease.* Nat Genet, 2010. **42**(8): p. 698-702.
136. Van der Houwen, T., P. Van Hagen, and J. Van Laar. *Immunopathogenesis of Behçet's disease and treatment modalities*. Semin Arthritis Rheum, 2022. **52**: 151956.

137. Dilşen, N., et al., *Comparative study of the skin pathergy test with blunt and sharp needles in Behçet's disease: confirmed specificity but decreased sensitivity with sharp needles.* Ann Rheum Dis, 1993. **52**(11): p. 823-825.
138. Sayarlioglu, M., et al., *Comparison of argon laser photocoagulation-induced cutaneous inflammation and skin pathergy test in Behçet's disease.* Clin Rheumatol, 2010. **29**(1): p. 59-63.
139. Bhakta, B., et al., *Behcet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity.* Rheumatology, 1999. **38**(8): p. 728-733.
140. Emmi, G., et al., *Behçet's syndrome pathophysiology and potential therapeutic targets.* Intern Emerg Med, 2014. **9**(3): p. 257-265.
141. Perazzio, S.F., L.E. Andrade, and A.W. De Souza, *Understanding Behçet's disease in the context of innate immunity activation.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 586558.
142. Park, U.C., T.W. Kim, and H.G. Yu, *Immunopathogenesis of ocular Behçet's disease.* J Immunol Res, 2014. **2014**(1): p. 653539.
143. Li, Z., et al., *Chemokines and chemokine receptors in Behçet's disease.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1109147.
144. van der Houwen, T. and J. van Laar, *Behçet's disease, and the role of TNF-α and TNF-α blockers.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(9): p. 3072.
145. Jang, D.-i., et al., *The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in autoimmune disease and current TNF-α inhibitors in therapeutics.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(5): p. 2719.
146. Van Loo, G. and M.J. Bertrand, *Death by TNF: a road to inflammation.* Nat Rev Immunol, 2023. **23**(5): p. 289-303.
147. Rodríguez-Carrio, J., et al., *Behçet disease: from pathogenesis to novel therapeutic options.* Pharmacol Res, 2021. **167**: p. 105593.
148. Cosan, F., et al., *Natural killer cell subsets and their functional activity in Behçet's disease.* Immunol Invest, 2017. **46**(4): p. 419-432.
149. Emmi, G., et al., *Behçet's syndrome as a model of thrombo-inflammation: the role of neutrophils.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 1085.
150. Daood, R., et al., *The role of neutrophil to lymphocytes ratio (NLR) as a predictor of disease activity in Behcet's syndrome—a comprehensive review.* J Clin Med, 2025. **14**(16): p. 5847.
151. Takeno, M., et al., *Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with behcet's disease and from hla-b51 transgenic mice.* Arthritis Rheum, 1995. **38**(3): p. 426-433.
152. Eksioglu-Demiralp, E., et al., *Neutrophil activation in Behçet's disease.* Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(5; SUPP/24): p. S-19.
153. Perazzio, S.F., et al., *Soluble CD40L is associated with increased oxidative burst and neutrophil extracellular trap release in Behçet's disease.* Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 235.
154. Seyahi, E. and S. Yurdakul, *Behçet's syndrome and thrombosis.* Mediterr J Hematol Infect Dis, 2011. **3**(1): p. e2011026.
155. Hatemi, G., et al., *2018 update of the EULAR recommendations for the management of Behçet's syndrome.* Ann Rheum Dis, 2018. **77**(6): p. 808-818.
156. Safi, R., et al., *Neutrophils contribute to vasculitis by increased release of neutrophil extracellular traps in Behçet's disease.* J Dermatol Sci, 2018. **92**(2): p. 143-150.

157. Becatti, M., et al., *Neutrophil activation promotes fibrinogen oxidation and thrombus formation in Behçet disease.* Circulation, 2016. **133**(3): p. 302-311.
158. Butta, N.V., et al. *Endothelial dysfunction and altered coagulation as mediators of thromboembolism in Behçet disease*. Semin Thromb Hemost, 2015. **41**(6): p. 621-628.
159. Kawakami, T., et al., *Presence of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behçet's disease.* J Dermatol, 2022. **49**(7): p. 741-745.
160. Li, H., et al., *Neutrophils: linking inflammation to thrombosis and unlocking new treatment horizons.* Int J Mol Sci, 2025. **26**(5): p. 1965.
161. Mereweather, L.J., et al., *Platelet–Neutrophil Crosstalk in Thrombosis.* Int J Mol Sci, 2023. **24**(2): p. 1266.
162. Laridan, E., K. Martinod, and S.F. De Meyer. *Neutrophil extracellular traps in arterial and venous thrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2019. **45**(1): p. 86-93.
163. Gao, X., et al., *Neutrophil extracellular traps mediated by platelet microvesicles promote thrombosis and brain injury in acute ischemic stroke.* Cell Commun Signal, 2024. **22**(1): p. 50.
164. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2010. **107**(36): p. 15880-15885.
165. Li, W., et al., *Platelet factor 4 promotes deep venous thrombosis by regulating the formation of neutrophil extracellular traps.* Thromb Res, 2024. **237**: p. 52-63.
166. Datsi, A., et al., *Stroke-derived neutrophils demonstrate higher formation potential and impaired resolution of CD66b+ driven neutrophil extracellular traps.* BMC Neurol, 2022. **22**(1): p. 186.
167. Ducroux, C., et al., *Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke.* Stroke, 2018. **49**(3): p. 754-757.
168. Yao, M., et al., *Neutrophil extracellular traps mediate deep vein thrombosis: from mechanism to therapy.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1198952.
169. Savchenko, A., et al., *Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development.* J Thromb Haemost, 2014. **12**(6): p. 860-870.
170. Yaykasli, K.O., et al., *Neutrophil extracellular trap-driven occlusive diseases.* Cells, 2021. **10**(9): p. 2208.
171. Burmeister, A., et al., *Impact of neutrophil extracellular traps on fluid properties, blood flow and complement activation.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 1078891.
172. Binda, V., G. Moroni, and P. Messa, *ANCA-associated vasculitis with renal involvement.* J Nephrol, 2018. **31**(2): p. 197-208.
173. Hunder, G.G., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: introduction.* Arthritis Rheum, 1990. **33**(8): p. 1065-1067.
174. Jennette, J.C., et al., *Nomenclature of systemic vasculitides.* Arthritis Rheum, 1994. **37**(2): p. 187-192.
175. Jennette, J.C., *Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides.* Clin Exp Nephrol, 2013. **17**: p. 603-606.
176. Kronbichler, A., et al., *Diagnosis and management of ANCA-associated vasculitis.* Lancet, 2024. **403**(10427): p. 683-698.

177. Jennette, J.C. and R.J. Falk, *Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease.* Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(8): p. 463-473.
178. Rathmann, J. and A.J. Mohammad, *Classification criteria for ANCA Associated Vasculitis–Ready for prime time?* Curr Rheumatol Rep, 2024. **26**(9): p. 332-342.
179. Yaseen, K. and B.F. Mandell, *ANCA associated vasculitis (AAV): a review for internists.* Postgrad Med, 2023. **135**(sup1): p. 3-13.
180. Mohammad, A.J., *An update on the epidemiology of ANCA-associated vasculitis.* Rheumatology, 2020. **59**(Supplement_3): p. iii42-iii50.
181. Geetha, D. and J.A. Jefferson, *ANCA-associated vasculitis: core curriculum 2020.* Am J Kidney Dis, 2020. **75**(1): p. 124-137.
182. Ross, C., J.-P. Makhzoum, and C. Pagnoux, *Updates in ANCA-associated vasculitis.* Eur J Rheumatol, 2022. **9**(3): p. 153-166.
183. Zhao, W.-M., et al., *Environmental factors influencing the risk of ANCA-associated vasculitis.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 991256.
184. Singh, H., U. Kumar, and S. Senapati, *Translational implications of humoral and cellular immune dysfunction in granulomatosis with polyangiitis.* Cytokine, 2023. **164**: p. 156154.
185. Trivioli, G., et al., *Genetics of ANCA-associated vasculitis: role in pathogenesis, classification and management.* Nat Rev Rheumatol, 2022. **18**(10): p. 559-574.
186. Wallace, Z.S., et al., *All-cause and cause-specific mortality in ANCA-associated vasculitis: overall and according to ANCA type.* Rheumatology, 2020. **59**(9): p. 2308-2315.
187. Lisowska, K.A. and A. Wardowska, *Immunopathology of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis.* Int J Mol Sci, 2025. **26**(13): p. 6065.
188. Potentas-Policewicz, M. and J. Fijolek, *Granulomatosis with polyangiitis: clinical characteristics and updates in diagnosis.* Front Med, 2024. **11**: p. 1369233.
189. Greco, A., et al., *Clinic manifestations in granulomatosis with polyangiitis.* Int J Immunopathol Pharmacol, 2016. **29**(2): p. 151-159.
190. Pyo, J.Y., et al., *Comparison of the 2022 ACR/EULAR classification criteria for antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with previous criteria.* Yonsei Med J, 2022. **64**(1): p. 11-17.
191. Stone, J.H., et al., *A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(4): p. 912-920.
192. Ahn, S.S., et al., *BVAS version 3 and BVAS/GPA: standing on the same line?* Clin Rheumatol, 2022. **41**(11): p. 3429-3437.
193. Suppiah, R., et al., *A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis.* Rheumatology, 2011. **50**(5): p. 899-905.
194. Mukhtyar, C., et al., *Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3).* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(12): p. 1827-1832.
195. Kitching, A.R., et al., *ANCA-associated vasculitis.* Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 71.
196. Antonelou, M., et al., *Neutrophils are key mediators in crescentic glomerulonephritis and targets for new therapeutic approaches.* Nephrol Dial Transplant, 2022. **37**(2): p. 230-238.
197. Goldmann, W.H., *Proteinase 3 associated with Wegener's granulomatosis.* Cell Biol Int, 2022. **46**(4): p. 548-553.

198. Kronbichler, A., et al., *Immunopathogenesis of ANCA-associated vasculitis.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(19): p. 7319.
199. Prendecki, M., et al., *The role of neutrophils in ANCA-associated vasculitis.* Immunol Lett, 2024. **270**: p. 106933.
200. Merino-Vico, A., J.P. van Hamburg, and S.W. Tas, *B lineage cells in ANCA-associated vasculitis.* Int J Mol Sci, 2021. **23**(1): p. 387.
201. Xiao, H., et al., *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice.* J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 955-963.
202. Müller, A., et al., *Granulomatous inflammation in ANCA-associated vasculitis.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(12): p. 6474.
203. Grayson, P.C., et al., *Neutrophil-related gene expression and low-density granulocytes associated with disease activity and response to treatment in antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis.* Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(7): p. 1922-1932.
204. Wang, H., et al., *Circulating level of neutrophil extracellular traps is not a useful biomarker for assessing disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis.* PloS one, 2016. **11**(2): p. e0148197.
205. Ui Mhaonaigh, A., et al., *Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogenous and hypo-responsive to anti-myeloperoxidase antibodies.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 2603.
206. Tektonidou, M.G., et al., *EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults.* Ann Rheum Dis, 2019. **78**(10): p. 1296-1304.
207. Willis, R. and S.S. Pierangeli, *Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome.* Auto Immun Highlights, 2011. **2**(2): p. 35-52.
208. Dabit, J.Y., et al., *Epidemiology of antiphospholipid syndrome in the general population.* Curr Rheumatol Rep, 2021. **23**(12): p. 85.
209. Ortiz-Fernández, L. and A.H. Sawalha, *Genetics of antiphospholipid syndrome.* Curr Rheumatol Rep, 2019. **21**(12): p. 65.
210. Rand, J.H., *Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome.* Circ Res, 2002. **90**(1): p. 29-37.
211. Meroni, P.L., et al., *Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies.* Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(6): p. 330-339.
212. Barbhaiya, M., et al., *The 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria.* Arthritis Rheumatol, 2023. **75**(10): p. 1687-1702.
213. Molhoek, J.E., P.G. de Groot, and R.T. Urbanus. *The lupus anticoagulant paradox*. Semin Thromb Hemost, 2018. **44**(5): p. 445-452.
214. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).* J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
215. Miyakis, S., B. Giannakopoulos, and S.A. Krilis, *Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease.* Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 335-346.
216. Ioannou, Y., et al., *Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β2-glycoprotein I.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(9): p. 2774-2782.
217. Salmon, J.E. and G. Girardi, *Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation.* J Reprod Immunol, 2008. **77**(1): p. 51-56.

218. Scherlinger, M., et al., *The role of platelets in immune-mediated inflammatory diseases.* Nat Rev Immunol, 2023. **23**(8): p. 495-510.
219. Willis, R. and E.B. Gonzalez, *Pathogenetic mechanisms of antiphospholipid antibody production in antiphospholipid syndrome.* World J Rheumatol, 2015. **5**(2): p. 59-68.
220. Yalavarthi, S., et al., *Antiphospholipid antibodies promote the release of neutrophil extracellular traps: a new mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome.* Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(11): p. 2990-3003.
221. Nayak, L., et al., *A targetable pathway in neutrophils mitigates both arterial and venous thrombosis.* Sci Transl Med, 2022. **14**(660): p. eabj7465.
222. Leffler, J., et al., *Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome.* Clin Exp Rheumatol, 2014. **32**(1): p. 66-70.
223. Meng, H., et al., *In vivo role of neutrophil extracellular traps in antiphospholipid antibody–mediated venous thrombosis.* Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(3): p. 655-667.
224. Ali, R.A., et al., *Adenosine receptor agonism protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1916.
225. Rysenga, C.E., et al., *Taxifolin inhibits NETosis through activation of Nrf2 and provides protective effects in models of lupus and antiphospholipid syndrome.* Rheumatology, 2024. **63**(7): p. 2006-2015.
226. Onur, E., et al., *Oxidative stress impairs endothelial nitric oxide levels in Behcets' disease.* Cutan Ocul Toxicol, 2011. **30**(3): p. 217-220.
227. Deniz, R., et al., *Improved sensitivity of the skin pathergy test with polysaccharide pneumococcal vaccine antigens in the diagnosis of Behcet disease.* Rheumatology, 2023. **62**(5): p. 1903-1909.
228. Di Cianni, F., et al., *The impact of environmental factors on aetiopathogenesis and clinical manifestations of Behçet's syndrome.* Clin Exp Rheumatol, 2024. **42**(10): p. 2008-13.
229. Ryu, H.-M., et al., *Characterization of immune responses associated with ERAP-1 expression in HSV-induced Behçet's disease mouse model.* Clin Immunol, 2023. **250**: p. 109305.
230. Belfeki, N., et al., *Etiopathogenesis of Behcet's disease: A systematic literature review.* Clin Immunol, 2025. **279**: p. 110549.
231. Mohanty, T., et al., *A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa.* Blood, 2015. **126**(18): p. 2128-2137.
232. Ogunkolade, W., et al., *Profiling the microbiome of oral and genital mucosal surfaces in Behçet's disease.* Clin Immunol, 2023. **253**: p. 109654.
233. Hatemi, G. and H. Yazici, *Behçet's syndrome and micro-organisms.* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2011. **25**(3): p. 389-406.
234. de Chambrun, M.P., et al., *New insights into the pathogenesis of Behcet's disease.* Autoimmun Rev, 2012. **11**(10): p. 687-698.
235. Wang, Y., et al., *Circulating cell-free DNA promotes inflammation in dermatomyositis patients with anti-NXP2 antibodies via the cGAS/STING pathway.* Rheumatology, 2025. **64**(4): p. 2272-2281.
236. Peng, Y., et al., *The potential roles of type I interferon activated neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome.* Arthritis Res Ther, 2022. **24**(1): p. 170.

237. Zhu, H., et al., *Bioinspired nanogels as cell-free DNA trapping and scavenging organelles for rheumatoid arthritis treatment.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2023. **120**(33): p. e2303385120.
238. Wang, F., et al., *Serological, fragmentomic, and epigenetic characteristics of cell-free DNA in patients with lupus nephritis.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 1001690.
239. Melamud, M.M., et al., *NETosis-Related Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Ankylosing Spondylitis: A Comparative Study.* Int J Mol Sci, 2025. **26**(24): p. 12127.
240. Suzuki, N., et al., *Characterization of circulating DNA in healthy human plasma.* Clin Chim Acta, 2008. **387**(1-2): p. 55-58.
241. Zambrano, F., et al., *Methods for Detecting Neutrophil Extracellular Trap Formation: From Microscopy to High-Throughput Technologies.* Int J Morphol 2025. **43**(4): p. 1421-1428.
242. Neubert, E., et al., *Serum and serum albumin inhibit in vitro formation of neutrophil extracellular traps (NETs).* Front Immunol, 2019. **10**: p. 12.
243. Donkel, S.J., et al., *Circulating Myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes as marker for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) levels and the association with cardiovascular risk factors in the general population.* PLoS One, 2021. **16**(8): p. e0253698.
244. Thålin, C., et al., *Quantification of citrullinated histones: Development of an improved assay to reliably quantify nucleosomal H3Cit in human plasma.* J Thromb Haemost, 2020. **18**(10): p. 2732-2743.
245. Tsourouktsoglou, T.-D., et al., *Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4.* Cell Rep, 2020. **31**(5): 107602.
246. Baltaci, M., *A review on disease activity scores in Behçet's disease (BD).* Arthritis Res Ther, 2003. **5**(Suppl 2): p. 7.
247. Mancuso, S., et al., *Anti-β2glycoprotein I-induced neutrophil extracellular traps cause endothelial activation.* Rheumatology, 2025. **64**(8): p. 4796-4805.
248. de Moraes Mazetto, B., et al., *Association between neutrophil extracellular traps (NETs) and thrombosis in antiphospholipid syndrome.* Thromb Res, 2022. **214**: p. 132-137.
249. Zaiema, S.E.G.E., et al., *Insight into antiphospholipid syndrome: the role and clinical utility of neutrophils extracellular traps formation.* Thromb J, 2024. **22**(1): p. 32.
250. Ali, R.A., et al., *Ginger intake suppresses neutrophil extracellular trap formation in autoimmune mice and healthy humans.* JCI insight, 2023. **8**(18): p. e172011.
251. Mauracher, L.-M., et al., *Neutrophil subpopulations and their activation potential in patients with antiphospholipid syndrome and healthy individuals.* Rheumatology, 2021. **60**(4): p. 1687-1699.

FORMLAR

Behçet Hastaliği Güncel Aktivite Formu (BDCAF)

Değerlendirme Tarihi	
Hasta Adı Soyadı	
Doğum Tarihi	
Cinsiyet	☐ Kadın ☐ Erkek
Merkez	
Değerlendiren Hekim	

Genel Açıklama

Bu değerlendirme, son 4 hafta içerisinde var olan semptomlara göre yapılmalıdır. Yalnızca hekimin Behçet hastalığı ile ilişkili olduğunu düşündüğü klinik bulgular değerlendirilmelidir.

Hastanın Hastalık Aktivitesine İlişkin Genel Değerlendirmesi

"Behçet hastalığınızı düşündüğünüzde, son 4 hafta içerisinde kendinizi nasıl hissettiniz?"

Çok iyi	İyi	Hafif kötü	Orta kötü	Kötü	Çok kötü	Son derece kötü
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Son 4 Haftadaki Klinik Bulgular

Klinik Bulgular	Yok	Var
Baş ağrısı	☐	☐
Oral ülser	☐	☐
Genital ülser	☐	☐
Eritema nodozum	☐	☐
Püstüler deri lezyonları	☐	☐
Artralji	☐	☐
Artrit	☐	☐
Bulantı / kusma / karın ağrısı	☐	☐
Diyare / rektal kanama	☐	☐

Göz Tutulumu

Son 4 hafta içerisinde aşağıdaki yakınmalar oldu mu?

Bulgular	Sağ Göz	Sol Göz
Kızarıklık	☐ Evet ☐ Hayır	☐ Evet ☐ Hayır
Ağrı	☐ Evet ☐ Hayır	☐ Evet ☐ Hayır
Bulanık görme	☐ Evet ☐ Hayır	☐ Evet ☐ Hayır

Yukarıdaki bulgulardan herhangi biri mevcut ise:

"Bu bulgu yeni gelişti mi?"

☐ Evet ☐ Hayır

Behçet Hastaliği Güncel Aktivite Formu Devamı (BDCAF)

Vasküler Tutulum

Bulgular	Yok	Var
Derin ven trombozu	☐	☐
Yüzeyel tromboflebit	☐	☐
Arteriyel tromboz / anevrizma	☐	☐

Nörolojik Tutulum

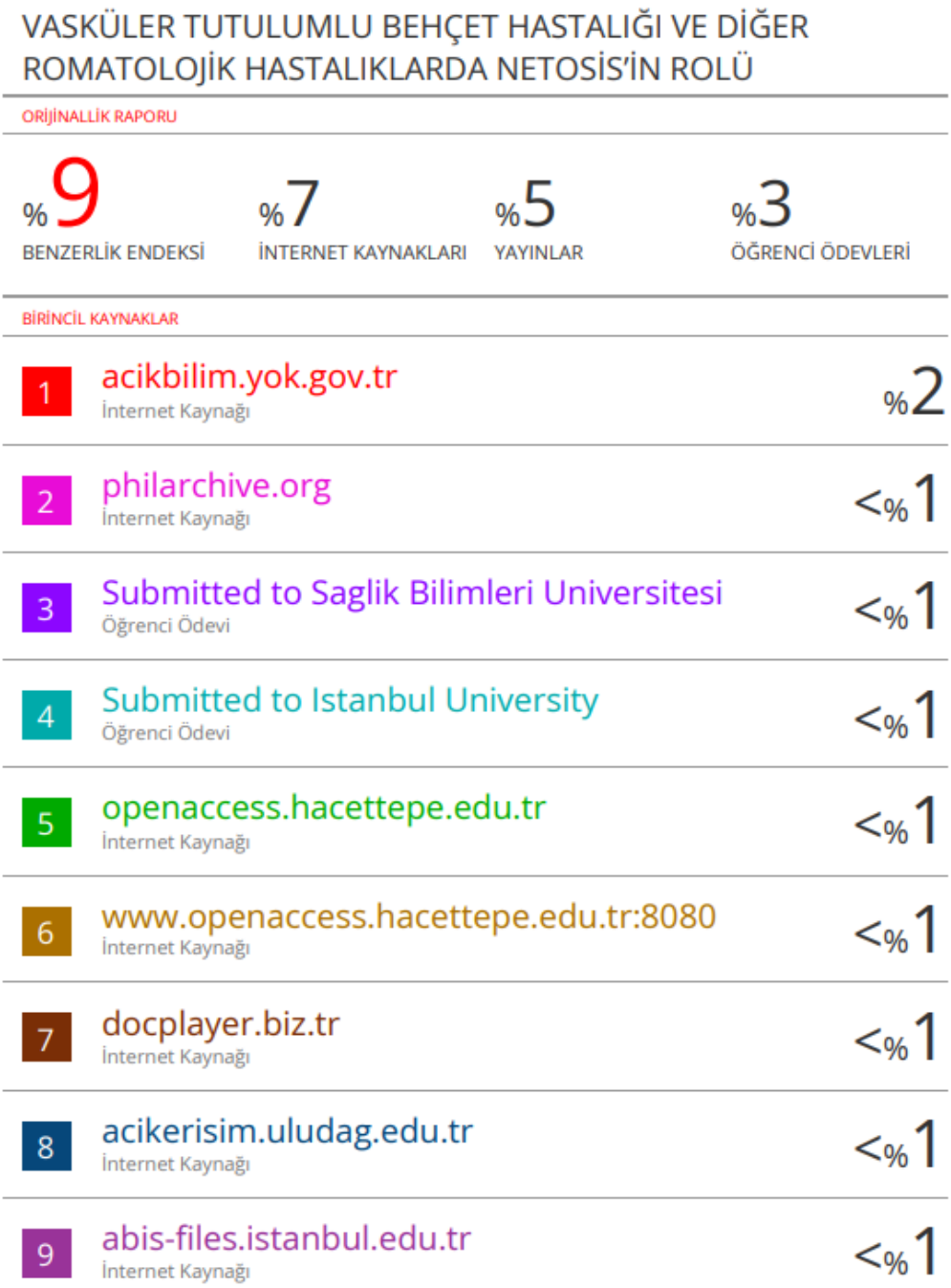
Bulgular	Yok	Var
Nörolojik yakınma / bulgu	☐	☐

Hekimin Genel Hastalık Aktivitesi Değerlendirmesi

İnaktif	Hafif aktif	Orta aktif	Şiddetli aktif
☐	☐	☐	☐

ETİK KURUL ONAYI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



VASKÜLER TUTULUMLU BEHÇET HASTALIĞI VE DİĞER ROMATOLOJİK HASTALIKLARDA NETOSİS'İN ROLÜ

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%7	%5	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	philarchive.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
5	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	abis-files.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1